INTRACELLULÄRER TURNOVER DER PHOSPHORYLASE KINASE UND IHRER VIER HETEROLOGEN UNTEREINHEITEN α, β, γ UND δ (CALMODULIN)

Dissertation
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr-Universität Bochum

vorgelegt von

JÖRG PETERSEN - VON GEHR

aus Süderbrarup

1981

Intracellulärer Turnover der Phosphorylase Kinase und ihrer vier heterologen Untereinheiten α, β, γ und δ (Calmodulin) aus Kaninchenskelettmuskulatur

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
der Abteilung für Chemie
an der Ruhr- Universität Bochum

vorgelegt von
Jörg Petersen - von Gehr
aus Süderbrarup

1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Referent: Prof. Dr. H.P. Jennissen

Korreferenten: Prof. Dr. A.W. Holldorf
Doz. Dr. K.P. Schäfer

Vorsitzender der Prüfungskommission: Prof. Dr. W. Kutzeln

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.1981

Danksagung

Für ihren Anteil an der Entstehung dieser Arbeit danke ich besonders

Herrn Prof. Dr. H.P. Jennissen für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten und sein unermüdliches Interesse und Engagement,

Herrn Prof. Dr. A.W. Holldorf und Herrn Doz. Dr. K.P. Schäfer für die Übernahme der Korreferate,

Herrn Dr. R.W. Veh und Frau D. Gies für die Anfertigung der Immunfluoreszenzaufnahmen,

Herrn Dr. H.P. Neubauer, Hoechst AG in Frankfurt, für die Immunisierung der Schafe,

Herrn Dr. R. Jaquet für die Erstellung der Computerprogramme,

Frau Dr. U. Jahnke für die Anleitung zur Benutzung der Computerprogramme,

Frau G. Botzet und Frau I. Biechbäumer für die wertvolle technische Hilfe

und allen Mitarbeitern unseres Hauses, die durch ihre Unterstützung an der Entstehung dieser Arbeit mitwirkten.

Abkürzungen

Neben den von der IUPAC- IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature (veröffentlicht in Eur. J. Biochem. 1, 259) empfohlenen wurden folgende Abkürzungen verwandt:

cAMP	cyclisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
cpm	gezählte radioaktive Impulse pro Minute
dpm	gezählte, korrigierte radioaktive Impulse pro Minute
DTE	1,4-Dithioerytrit
EGTA	Ethylenglycol-bis(β-Aminoäthyläther)-N,N'-tetraessigsäure
GAPDH	Glycerin-3-phosphat- Dehydrogenase
GP	Natrium-2-Glycerinphosphat
ME	2-Mercaptoäthanol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
SDS	Natriumdodecylphosphat
U	Einheiten der enzymatischen Aktivität

Verzeichnis der verwendeten Symbole

	EINHEIT	DEFINITION
F^*	dpm/µMol Leu	spezifische Radioaktivität des Leucins im Präcursorpool (allgemein)
F_i^*	dpm/µMol Leu	spezifische Radioaktivität des Leucins im intrazellulären Aminosäurepool
F_e^*	dpm/µMol Leu	spezifische Radioaktivität des Leucins im extrazellulären Aminosäurepool
$F_i^{*'}$	dpm/µMol Leu	spezifische Radioaktivität des Leucins in einem hypothetischen Präcursorpool
P^*	dpm/µMol Leu	spezifische Radioaktivität des Leucins im Polypeptid (allgemein)
P_i^{*x}	dpm/µMol Leu	spezifische Radioaktivität des Leucins im Polypeptid x, Präcursorpool: F_i^*
P_e^{*x}	dpm/µMol Leu	spezifische Radioaktivität des Leucins im Polypeptid x, Präcursorpool: F_e^*
$P_i^{*',x}$	dpm/µMol Leu	spezifische Radioaktivität des Leucins im Polypeptid x, Präcursorpool: $F_i^{*'}$
k_d'	$Tage^{-1}$	apparente Degradationskonstante
k_p	$Tage^{-1}$	Turnoverkonstante der Degradation
k_{pi}^x	$Tage^{-1}$	Turnoverkonstante der Degradation des Polypeptids x, Präcursorpool: F_i^*
k_{pe}^x	$Tage^{-1}$	Turnoverkonstante der Degradation des Polypeptids x, Präcursorpool: F_e^*
$k_{pi}'^x$	$Tage^{-1}$	apparente Turnoverkonstante der Degradation des Polypeptids x, Präcursorpool: $F_i^{*'}$
$k_{pi}'^{x1}$	$Tage^{-1}$	1. apparente Turnoverkonstante der Degradation bei Anpassung mit 2 P_i^*- Kurven
$k_{pe}'^{x2}$	$Tage^{-1}$	2. apparente Turnoverkonstante der Degradation bei Anpassung mit 2 P_i^*- Kurven

k_s	$\frac{mg}{Tag.g}$	Turnoverkonstante der Synthese
k_{si}^x	$\frac{mg}{Tag.g}$	Turnoverkonstante der Synthese des Polypeptids x, Präcursorpool: F_i^*

Vorveröffentlichungen

Ein Teil der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist an folgenden Stellen veröffentlicht worden:

Jennissen, H.P., Veh, R.W., Petersen, J.K.H. und Neubauer, H.P. (1979)
Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 293

Petersen, J.K.H. und Jennissen, H.P. (1979)
Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 360, 340

Jennissen, H.P., Veh, R.W. und Petersen, J.K.H. (1980)
J. Musc. Res. Cell Mot. 1, 210

Petersen, J.K.H. und Jennissen, H.P. (1980)
J. Musc. Res. Cell Mot. 1, 215

Veh, R.W., Mehnert, F.E., Petersen, J.K.H. und Jennissen, H.P. (1980)
Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 342

Petersen, J.K.H. und Jennissen, H.P. (1981)
Biochemical Society Transactions 9, 141P

Petersen, J.K.H., Veh, R.W. und Jennissen, H.P. (1981)
Adv. Cycl. Nucl. Res. 14, in print

Jennissen, H.P. und Petersen, J.K.H. (1981)
Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 362, 212

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Methoden	6
2.1.	Präparative Methoden	6
2.1.1.	Auswahl der Tiere und Vorbereitung der Enzympräparationen	6
2.1.2.	In vivo Markierung von Proteinen mit radioaktiv markierten Aminosäuren	6
2.1.3.	Präparation von Phosphorylase Kinase	7
2.1.4.	Präparation von Phosphorylase b	9
2.1.5.	Präparation von sarkoplasmatischem Retikulum	11
2.1.6.	Präparation von GAPDH	12
2.1.7.	Präparation von Glycogensynthase	13
2.1.8.	Präparation von Calsequestrin	
2.1.9.	Isolierung der δ- Untereinheit der Phosphorylase Kinase	14
2.1.10.	Isolierung der γ- Untereinheit der Phosphorylase Kinase	15
2.1.11.	Isolierung der Ca^{2+}- Transport ATPase aus sarkoplasmatischem Retikulum	16
2.1.12.	Präparative Trennungen von SDS- denaturierten Proteinen mit der präparativen Polyacrylamid- Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS	16
2.1.13.	Präparative Trennungen von Aminosäuren und Peptiden mit der Hochspannungselektrophorese	18
2.1.14.	Herstellung von Butylamin- substituierter Sepharose 4B	20
2.1.15.	Immunisierung von Schafen mit den isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase	21
2.1.16.	Aufarbeitung antikörperhaltiger Seren	21
2.1.17.	Immunfluoreszenz von Gewebe durch FITC- markierte Antikörper	22

		Seite
2.1.18.	Carboxymethylierung freier -SH Gruppen	23
2.2.	Analytische Methoden	24
2.2.1.	Bestimmung der Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase im automatisierten Test	24
2.2.2.	Bestimmung der Enzymaktivität der Glycogen- Phosphorylase im automatisierten Test	24
2.2.3.	Bestimmung der Enzymaktivität der ATPase des sarkoplasmatischen Retikulum	25
2.2.4.	Bestimmung der Enzymaktivität der Glycogensynthase	26
2.2.5.	Bestimmung der Proteinkonzentration im automatisierten Test	26
2.2.6.	Bestimmung der Phosphatkonzentration im automatisierten Test	27
2.2.7.	Polyacrylamid- Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS	27
2.2.8.	Quantitative Auswertung von SDS-Elektrophorese- Gelen	29
2.2.9.	Angaben zur Radioaktivitätsmessung	29
2.2.10.	Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen	30
2.2.11.	Quantitative Tryptophanbestimmung in Proteinen	31
2.2.12.	Quantitative Cysteinbestimmung in Proteinen	31
2.2.13.	Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten durch analytische Ultrazentrifugation	32
2.2.14.	Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony	33
2.2.15.	Bestimmung des Substitutionsgrades in aminsubstituierter Sepharose	34
2.3.	Berechnungen	
2.3.1.	PROGRAMM I	35
2.3.2.	PROGRAMM II	35

		Seite
2.3.3.	PROGRAMM III	36
3.	Theoretische Grundlagen der benutzten Methoden zur Messung des Turnovers von Proteinen	37
3.1.	Einfachmarkierungsexperimente	39
3.2.	Doppelmarkierungsexperiment	42
4.	Ergebnisse	45
4.1.	Isolierung von Polypeptiden und Aminosäuren für die Turnoveruntersuchungen	45
4.1.1.	Präparation der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase	45
4.1.1.1.	Reinheitskriterien für die isolierten Untereinheiten	53
4.1.2.	Abänderung bekannter Präparationsmethoden zur Isolierung weiterer löslicher Muskelenzyme für die Erfordernisse dieser Arbeit	59
4.1.3.	Abänderung bekannter Präparationsmethoden zur Isolierung membrangebundener Muskelenzyme für die Erfordernisse dieser Arbeit	61
4.1.4.	Präparation von freiem Leucin aus Serum und Rohextrakt	63
4.2.	Messung der spezifischen Radioaktivität von Leucin in Proteinen, Serum und Rohextrakt nach Pulsmarkierung	72
4.2.1.	Grundlagen der Radioaktivitätsmessung	72
4.2.2.	Messung der spezifischen Radioaktivität in dem extrazellulären und intrazellulären Aminosäurepool der Muskelzelle	77
4.2.3.	Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase	81
4.2.4.	Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in weiterer löslichen Muskelenzymen	85

		Seite
4.2.5.	Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in Membranproteinen der Muskelzelle	87
4.2.6.	Auswertung der Pulsmarkierungsexperimente	89
4.2.6.1.	Ermittlung der relativen Turnoverraten aus den Pulsmarkierungsexperimenten nach 3 verschiedenen Methoden	89
4.2.6.2.	Vergleich der relativen Turnoverraten, die nach 3 verschiedenen Methoden aus den Pulsmarkierungsexperimenten ermittelt wurden	93
4.2.7.	Doppelmarkierungsexperiment	94
4.2.7.1.	Versuchsdurchführung	94
4.2.7.2.	Ermittlung der relativen Turnoverraten aus dem Doppelmarkierungsexperiment	95
4.2.8.	Vergleich der relativen Turnoverraten, die aus den Pulsmarkierungsexperimenten ermittelt wurden, mit denen aus dem Doppelmarkierungsexperiment	97
4.2.9.	Berechnung tatsächlicher Halbwertszeiten der Proteine durch nicht lineare Kurvenanpassung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Polypeptiden nach Pulsmarkierung	98
4.2.9.1.	Anpassung der spezifischen Radioaktivitäten des Leucins im Präcursorpool als eine exponentielle Funktion der Zeit	98
4.2.9.2.	Nicht lineare Anpassung der Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Proteinen	99
4.2.9.3.	Zerlegung der experimentell bestimmten Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Proteinen	105
4.2.9.4.	Verbesserung der Kurvenanpassung für die δ- Untereinheit	109
4.2.9.5.	Vergleich der Turnoverergebnisse, die durch Auswertung der Doppelmarkierung	111

Seite

und den apparenten Degradationsraten gewonnen wurden mit den nach Computerauswertung erhaltenen Ergebnissen der gleichen experimentellen Werte

4.3. Immunbiochemische Untersuchungen 113

4.3.1. Herstellung monospezifischer Antikörper gegen die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase 113

4.3.1.1. Entwicklung des Titers hemmender und aktivierender Antikörper gegen die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase 113

4.3.1.2. Einfluß der Antikörperkonzentration auf die Aktivität der Phosphorylase Kinase 118

4.3.1.3. Immunpräzipitationsverhalten 122

4.3.2. Herstellung von Antikörpern gegen die Ca^{2+}- Transport ATPase des sarkoplasmatischen Retikulum 124

4.3.2.1. Untersuchung der hemmenden Eigenschaft der Anti- ATPase auf die Aktivität der Ca^{2+}- Transport ATPase 124

4.3.2.2. Präzipitationsverhalten und Entwicklung des Titers präzipitierender Antikörper gegen die Ca^{2+}- Transport ATPase 125

4.4. Lokalisationsstudien zu den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase 127

4.4.1. Anfärbung von Gewebeschnitten mit den FITC- markierten Antikörpern gegen die einzelnen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase 127

4.4.2. Anfärbung zusätzlicher Strukturen der Muskelzelle durch FITC- markiertes Anti α und Anti β 129

4.5. Untersuchung der Verteilung von Phosphorylase b, Ca^{2+}- Transport ATPase 132

		Seite
5.	Diskussion	135
5.1.	Zur Problematik des "Subunit exchange"	135
5.2.	Bestimmung der relativen Turnoverraten aus den initialen Einbauraten	137
5.3.	Ermittlung der relativen Turnoverraten aus den maximalen Einbauraten	140
5.4.	Ermittlung der relativen Turnoverraten aus den apparenten Geschwindigkeitskonstanten des Abbaus	141
5.5.	Bestimmung relativer Turnoverraten mit dem Doppelmarkierungsexperiment	144
5.6.	Zur Problematik des Präcursors	147
5.7.	Computerauswertung der Pulsmarkierungsexperimente	149
5.8.	Erste Hinweise auf verschiedene Präcursorpools für die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase	152
5.9.	Turnover und Immunfluoreszenz	155
6.	Zusammenfassung	157
7.	Literaturverzeichnis	159
8.	Anhang (Texte der FORTRAN-Programme)	170
8.1.	PROGRAMM I	170
8.2.	PROGRAMM II	174
8.3.	PROGRAMM III	175

1. Einleitung

Bis in die dreißiger Jahre hinein hielt man die lebende Zelle für eine chemische Maschine, die exogene Nahrung zwecks Energiegewinnung verbrannt, selbst aber keinen metabolischen Prozessen unterworfen war. Im Jahre 1936 fanden Borsook und Keighley (BORSOOK und KEIGHLEY, 1936) erste Hinweise, daß auch intrazelluläre Proteine laufend auf- und abgebaut werden, nachdem sie mit konventionellen chemischen Methoden die Stickstoffbilanz des menschlichen Körpers untersucht hatten. Überzeugende Argumente für den Metabolismus intrazellulärer Proteine aber brachte erst Schönheimer im Jahre 1939 (SCHÖNHEIMER, 1939), nachdem es möglich geworden war, Aminosäuren radioaktiv zu markieren. Er stellte fest, daß eine Ratte, die mit ^{15}N- markiertem d,l- Tyrosin 10 Tage lang gefüttert worden war, in dieser Zeit etwa nur 50 % der verabreichten Radioaktivität über den Urin wieder ausschied. Den größten Teil der verbliebenen Radioaktivität fand er in Gewebeproteine eingebaut. Nach Hydrolyse dieser Proteine entdeckte er neben dem Tyrosin auch andere radioaktiv markierte Aminosäuren. Aus diesem Befund schloß er, daß auch Tyrosin metabolisiert wird und der radioaktive Stickstoff zur Synthese anderer Aminosäuren verwendet wird.

Bis heute wurde gezeigt, daß alle Makromoleküle der lebenden Zelle mit Ausnahme der DNA laufend degradiert und resynthetisiert werden, ein Prozeß, der als intrazellulärer Turnover dieser Makromoleküle bezeichnet wird (ZAK et al., 1979).

Der Begriff Turnover bezieht sich ganz allgemein auf die Erneuerung einer Substanz A in einem Körper oder Gewebe, wobei sich die Menge der Sustanz gar nicht oder nur unwesentlich ändert (ZILVERSMIT, 1960). Für den Proteinturnover bedeutet dies, daß Proteine laufend synthetisiert und degradiert werden. Bei gesunden, ausgewachsenen Individuen bleibt die Konzentration der Proteine in Blut und Gewebe konstant, die Synthese und Degradation dieser Proteine aber laufen weiter. Es handelt sich hier also um einen

dynamischen Prozeß, bei dem gleich viele Proteinmoleküle synthetisiert und degradiert werden - es besteht ein Fließgleichgewicht ("Steady state"). Dieser "Steady state"- Zustand ist gestört, wenn die Syntheserate größer oder kleiner ist als die Degradationsrate, wie es z.B. bei wachsenden oder kranken Individuen der Fall ist (ZAK et al., 1979).
Die Turnoverrate ist ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der ein Protein in einem Kompartiment (synthetisiert und degradiert) erneuert wird (ZILVERSMIT, 1960). Einerseits wird eine Abhängigkeit der Turnoverrate von folgenden individuellen Eigenschaften einzelner Proteine angegeben wie thermodynamische Stabilität (MCLENDON und RADNAY, 1978), Molekulargewicht (DICE und SCHIMKE, 1972; DICE et al., 1973), isoelektrischer Punkt (DICE und GOLDBERG, 1976), Hydrophobizität (BOHLEY et al., 1977; SEGAL et al. 1976) und Affinität zu Proteasen (BOND, 1971), andererseits aber kann sie beeinflußt werden durch Hormone (MANCHESTER, 1970), Ernährungszustand (MUNRO, 1964) und Aktivitätszustand (GOLDBERG, 1972) des untersuchten Gewebes, wobei oft der "Steady state"-Zustand gestört wird. Beispielsweise erhöhen Insulin und Aminosäuren mit verzweigten Ketten wie Leucin, Isoleucin und Valin die Syntheserate und erniedrigen die Degradationsrate von Proteinen, so daß deren Konzentration im Gewebe ansteigt (FULKS et al., 1975).
Diese Ausführungen sollen nur ein Hinweis darauf sein, daß experimentell ermittelte Turnoverraten nicht allgemein gültig sind, sondern immer im Zusammenhang mit äußeren und inneren Einflüssen während des Experimentes gesehen werden müssen.
Proteinturnoverstudien können wichtige Informationen über den Mechanismus und die Regulation des Proteinkatabolismus liefern. Über die Ein- und Ausbauraten von radioaktiv markierten Aminosäuren ist es möglich, Reaktionskonstanten der Synthese und Degradation zu bestimmen. Aus diesem Grund sind besonders Turnoverexperimente an oligomeren Proteinen interessant, über deren Auf- und Abbau bisher nur wenig Kenntnisse existieren. So gibt es für die Degradation eines oligomeren Proteins zwei Möglichkeiten: einerseits kann die

Einheit der Degradation das oligomere Protein insgesamt sein, was zur Folge hat, daß die Untereinheiten gleiche Turnoverraten besitzen. Ein Beispiel hierfür ist die Aldolase, bei der gezeigt werden konnte, daß es in vivo keinen Subunitexchange gibt (LEBHERZ, 1975). Andererseits können die einzelnen Untereinheiten wie z.B. beim Troponin (KOIZUMI, 1974; MARTIN, 1981) die Einheiten der Degradation sein. Eine unterschiedliche Turnoverrate der Untereinheiten eines oligomeren Proteins ist ein starkes Indiz für das Vorliegen eines Subunitexchanges und damit für die Tatsache, daß die einzelnen Untereinheiten Produkte verschiedener Gene sind.

Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit ist die Phosphorylase Kinase (EC 2.7.1.38) (KREBS und FISCHER, 1956; COHEN et al., 1978), eine Ca^{2+} abhängige Proteinkinase (FISCHER et al., 1971) gewählt worden, weil sie das Schlüsselenzym der Glycogenolyse ist (siehe Abbildung 1), in vielen Geweben nachgewiesen werden konnte (KREBS und FISCHER, 1956; DRUMMOND et al., 1969; OZAWA, 1972; GEAR und SCHNEIDER, 1975) und am besten aus Kaninchenskelettmuskulatur charakterisiert worden ist (KREBS und FISCHER, 1956). Ferner schienen erste Hinweise auf einen unterschiedlichen Turnover der α + β- Untereinheit von der γ- Untereinheit dieses Projekt besonders aussichtsreich zu machen (JENNISSEN et al., 1975). Das Isoenzym der Phosphorylase Kinase aus der sogenannten weißen Muskulatur (JENNISSEN und HEILMEYER, 1974) besitzt eine Molmasse von $1,28 \times 10^6$ und besteht aus vier heterologen Untereinheiten $(\alpha,\beta,\gamma,\delta)_4$ (HAYAKAWA et al., 1973; COHEN, 1973; COHEN et al., 1978). Die Molekulargewichte der einzelnen Untereinheiten betragen: α 135000, β 120000, γ 42000 und δ 17000. Die δ- Untereinheit gehört zu der Gruppe der Calmoduline (CHEUNG, 1980), der Ca^{2+}- Akzeptorproteine der Eukaryonten. Das Isoenzym aus der sogenannten roten Muskulatur (JENNISSEN und HEILMEYER, 1974) enthält an Stelle der α- Untereinheit die etwas leichtere Untereinheit α'.

Die Funktion der einzelnen Untereinheiten ist noch nicht sicher bekannt. Während man der α- Untereinheit allgemeine

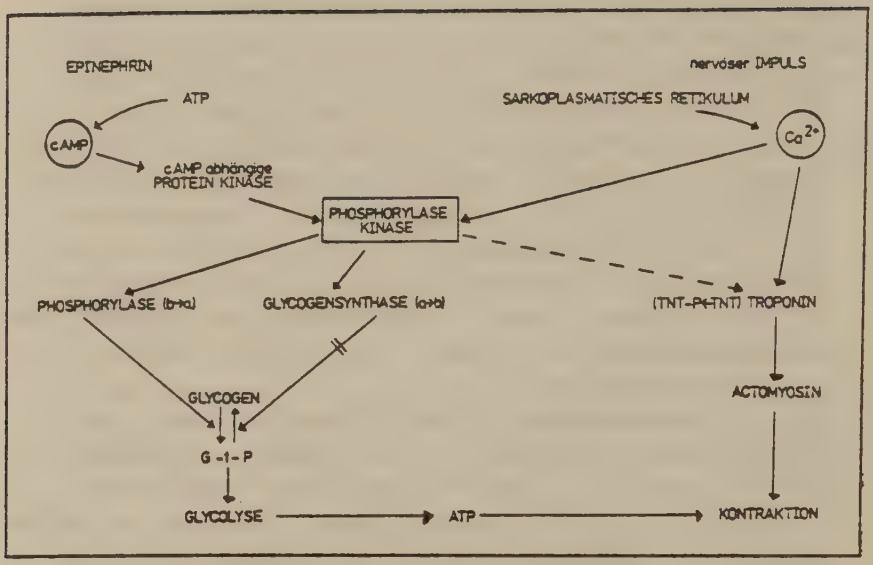


Abb. 1: Regulatorische Rolle und Funktion der Phosphorylase Kinase in Säugetierskelettmuskulatur.

regulatorische Funktionen zuschreibt, scheinen die Untereinheiten β und γ an der Katalyse beteiligt zu sein (SKUSTER und GRAVES, 1977; FISCHER et al., 1976). Gesichert ist, daß die δ- Untereinheit dem Holoenzym Ca^{2+}- Sensibilität verleiht (SHENOLIKAR et al., 1979).
Die Phosphorylase Kinase ist durch zwei unterschiedliche Signale stimulierbar: über einen hormonellen Reiz (Epinephrin) durch den "Second messenger" cAMP (DE LANGE et al., 1968) und durch einen elektrischen Reiz über den "Second messenger" Ca^{2+} (HEILMEYER et al., 1970; BROSTROM et al., 1971).
In vivo phosphoryliert sie unter anderem die Phosphorylase b (KREBS et al., 1958) und Glycogensynthase a (SCHLENDER et al., 1969). In vitro wird auch eine Autophosphorylierung (WALSH et al., 1968; WANG et al., 1976) und eine Phosphorylierung der TNI- und TNT- Untereinheit des Troponins beobachtet (STULL et al., 1972; PERRY und COLE, 1973; PERRY und COLE 1974).

Um verschiedene Kompartimente der Muskelzelle abzudecken, werden neben der Phosphorylase Kinase und ihren Substratproteinen Phosphorylase b und Glycogensynthase a (lösliche Muskelenzyme) auch Turnoverstudien an den membrangebundenen Enzymen Ca^{2+}- Transport ATPase (MW 100000) (MCFARLAND und INESI, 1971) Calsequestrin (MW 52000) (MACLENNAN und WONG, 1971) vorgenommen, die zusammen mit den "Acidic proteins" (MW 25000- 35000) (MACLENNAN et al. 1973) an dem energieverbrauchenden Rücktransport (MACLENNAN und HOLLAND, 1975) von Ca^{2+} nach jeder Muskelkontraktion durch die Membran hindurch in die Zisternen des sarkoplasmatischen Retikulum beteiligt sind.
Von der experimentellen Technik her baut die vorliegende Arbeit auf der zuerst von Velick beschriebenen Pulsmarkierungsmethode auf (SIMPSON und VELICK, 1954; HEIMBERG und VELICK, 1954; VELICK, 1956). Er war es, der in den fünfziger Jahren die Turnoverexperimente von Schönheimer an Enzymen der Kaninchenskelettmuskulatur weiterführte. Ergänzend und klärend zu unseren Untersuchungen wird die von Arias et al. (ARIAS et al., 1969) entwickelte Doppelmarkierungsmethode auf die Muskelenzyme angewandt.
Für eine quantitative Beschreibung des komplexen Verlaufs der Radioaktivitätseinbaukurven der untersuchten Proteine wird das mathematische Modell des Turnovers von Zilversmit (ZILVERSMIT, 1942; ZILVERSMIT et al., 1960) mit Hilfe eines Computers angewendet und kritisch diskutiert.
Abschließend wird mit monospezifischen Antikörpern gegen die isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase, deren Herstellung zum erstenmal im Laufe dieser Arbeit gelang, die Lokalisation dieser Proteine in der Zelle untersucht. Es zeigte sich, daß die gefundene Lokalisation der Untereinheiten am plausibelsten mit den Ergebnissen der Turnoverexperimente erklärt werden kann.

2. Methoden

2.1. Präparative Methoden

2.1.1. Auswahl der Tiere und Vorbereitung der Enzympräparationen

Für alle in dieser Arbeit durchgeführten Enzympräparationen werden nur männliche Kaninchen des Inzuchtstammes "Weiße Neuseeländer" (3- 4 kg) verwendet. Zur Akklimatisierung und Quarantäne werden die Tiere schon 14 Tage vor Experimentbeginn unter Versuchsbedingungen (Raumtemperatur, Nahrung) gehalten.
Die Kaninchen werden durch Injektion von 2- 5 ml Evipan-Natrium in die Ohrvene getötet und durch Eröffnen der Halsschlagader ausgeblutet. Nach dem Enthäuten werden die Tiere für 10- 15 Minuten auf Eis gelegt, worauf dann das Skelettmuskelfleisch exzidiert wird, auf Eis gelegt wird und anschließend im Fleischwolf zerkleinert wird.
Die von den Kaninchen erhaltenen Gewebe werden entweder gleich weiterverarbeitet oder kleingeschnitten und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Bis auf das Serum werden dann alle Gewebe in einer Gefriertrocknungsanlage (Fa. Leybold, Kapazität 15 l) lyophilisiert und bei -20° C gelagert. Nach Vorversuchen sind die Gewebe und die darin enthaltenen Enzyme in diesem Zustand praktisch unbegrenzt haltbar.

2.1.2. In vivo Markierung von Proteinen mit radioaktiv markierten Aminosäuren

a) Pulsmarkierung mit ^{3}H- Leucin:
Den Kaninchen wird eine Dosis von 180 µCi/kg L-(4,5-^{3}H)Leucin (spez. Radioaktivität: 48 Ci/mMol, radioaktive Konzentration: 1,0 mCi/ml in einer 2 %igen alkoholischen Lösung, Amersham Buchler) durch eine einmalige Injektion in die Ohrvene verabreicht.
Für die Dauer des Versuches (Inkorporation des ^{3}H- Leucins) werden die Tiere mit Trockenfutter und Wasser ernährt. Die

Gewichtskonstanz der Kaninchen wird an jedem dritten Tag überprüft.

b) Doppelisotopenmarkierung mit ^{3}H- und ^{14}C-Leucin (ARIAS et al., 1969):
Zuerst wird den Kaninchen eine Dosis von 310 µCi/kg ^{3}H- Leucin (siehe 2.1.2.a) in die Ohrvene gespritzt.
Genau 20 Tage später wird den Tieren 35 µCi/kg L-(U-^{14}C)Leucin (spez. Radioaktivität: 339 mCi/mMol, radioaktive Konzentration: 50 µCi/ml in 2 %iger alkoholischer Lösung, Amersham Buchler) in die Ohrvene verabreicht. Nach weiteren 24 Stunden werden die Kaninchen getötet und geschlachtet wie unter 2.1.1. beschrieben.

2.1.3. Präparation von Phosphorylase- Kinase nach COHEN (1973), modifiziert nach JENNISSEN und HEILMEYER (1975)

Die gesamte Präparation erfolgt im Kühlraum bei 4° C bzw. auf Eis.
Extraktion: Viermal je 1 kg Kaninchenskelettmuskelfleisch werden im Fleischwolf zerkleinert und mit 2,5 l 4 mM EDTA / 10 mM Tris, pH ca. 9 im Homogenisator (Waring- Blendor, Stufe "medium") 45 Sekunden lang homogenisiert. Der viskose Brei (pH 6,5- 6,8) wird 25 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert.
Säurefällung: Der Überstand (9,2 l) wird über Glaswolle filtriert und langsam mit 1 M Essigsäure versetzt, bis ein pH- Wert von 6,1- 5,9 vorliegt. Der Endpunkt der Fällung wird daran erkannt, daß die Zahlen einer mit der Suspension gefüllten 20 ml Meßpipette nicht mehr von der Rückseite her lesbar sind. Die Suspension sollte nicht länger als 15 Minuten stehen; sie wird für 25 Minuten bei 13000 x g zentrifugiert.
Ultrazentrifugation: Das Sediment wird sofort mit einem gleichen Volumen 0,1 M GP / 4 mM EDTA / 20 mM ME / 0,02 % NaN_3, pH 8,0 neutralisiert und anschließend in einem Potter- Homogenisator in maximal 400 ml 50 mM GP / 2 mM EDTA / 20 mM ME /

0,02 % NaN_3, pH 7,0 ("Puffer I") homogenisiert. Die Suspension wird 100 Minuten bei 110000 x g zentrifugiert, der Überstand über Glaswolle filtriert. Das Sediment ("30 P") wird bei -20° C gelagert und dient später als Ausgangsprodukt für andere Enzympräparationen.

Ammoniumsulfatfällung: Das Filtrat wird mit 52 % seines Volumens an 3,5 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 7,0 versetzt. Nach zehnminütigem Stehen wird die Suspension 15 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird in 30 ml Puffer I vorsichtig aufgenommen, zur Entfernung des Ammoniumsulfates eine Stunde gegen 2 l Puffer I dialysiert und anschließend 10 Minuten bei 27000 x g zentrifugiert.

Gelfiltration: Der Überstand (ca. 50 ml) wird auf eine Sepharose 4B- Säule (10 cm Ø x 27 cm Gelhöhe) aufgetragen, die mit Puffer I äquilibriert ist. Über Nacht wird mit etwa 3 l des gleichen Puffers eluiert (Durchflußgeschwindigkeit: 450 ml/h, Fraktionsvolumen: 14,5 ml). Es werden drei bei 280 nm absorbierende Proteingipfel beobachtet. Jede dritte Fraktion des mittleren Gipfels wird auf Phosphorylase Kinase- Aktivität untersucht, und die Aktivität enthaltenden Fraktionen werden vereinigt.

Ionenaustauschchromatographie: Die Lösung (ca. 600 ml) wird auf eine DEAE- Sephacel- Zellulose- Säule (5 cm Ø x 17 cm Gelhöhe) aufgetragen, die mit Puffer I äquilibriert ist. Nach dem Waschen mit 50 mM GP / 2 mM EDTA / 1 mM DTE / 0,02 % NaN_3, pH 7,0 wird mit 1,2 l eines von 0 M auf 1 M ansteigenden NaCl-Gradienten im gleichen Puffer eluiert (Durchflußgeschwindigkeit: 100 ml/h, Fraktionsvolumen: 13,4 ml). Bei ca. 0,2 M NaCl eluiert ein bei 280 nm absorbierender Gipfel, von dem jede dritte Fraktion SDS- gelelektrophoretisch untersucht wird. Die Fraktionen, die nur die 4 Phosphorylase Kinase- Untereinheiten enthalten, werden vereinigt.

Ankonzentrieren und Lagerung: Die Lösung wird mit 52 % ihres Volumens an 3,5 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 7,0 versetzt. Nach zehnminütigem Stehen wird die Suspension 15 Minuten bei 12000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird anschließend in so viel Puffer I gelöst, daß eine Proteinkonzentration von 5- 7 mg/ml erreicht wird. Das Konzentrat wird anschließend bei

-20° C gelagert oder für die Turnoveruntersuchungen lyophilisiert.

2.1.4. Präparation der Phosphorylase b

a) Präparation nach FISCHER und KREBS (1958), modifiziert:
Vorbereitung der Präparation: 3 kg Kaninchenskelettmuskulatur, die in Portionen zu je 500 g in Plastikbeuteln bei -20° C gelagert wurde, werden in 30- 38° C warmem Leitungs-Wasser für etwa 30 Minuten aufgetaut. Es ist darauf zu achten, daß die Plastikbeutel gut verschlossen sind, so daß das Fleisch nicht mit dem Leitungswasser extrahiert wird. Das Fleisch gilt als aufgetaut, wenn die äußeren Schichten weich und das Innere der Pakete angetaut ist. In dieser Form wird das Fleisch durch den Fleischwolf gedreht.
Extraktion: Die Skelettmuskulatur wird mit der gleichen Gewichtsmenge destillierten Wassers versetzt und der erhaltene Brei für 15 Minuten bei Raumtemperatur gerührt. Zur Gewinnung des Rohextraktes wird der Brei anschließend portionsweise in eine vierfache Lage Gaze gepackt und in einer Wäscheschleuder (Miele -WZ 5907-, 1465 U/min) abgepreßt. Der Rückstand wird mit dem gleichen Volumen Wasser versetzt, 10 Minuten gerührt und nochmals abgeschleudert. Zu einer dritten Extraktion wird der Rückstand schließlich mit dem halben Volumen Wasser versetzt, 5 Minuten gerührt und abgeschleudert. Die vereinigten Extrakte werden durch Glaswolle filtriert und auf Eis gestellt. Alle weiteren Schritte werden, sofern nicht anders angegeben, auf Eis bzw. bei 4° C durchgeführt.
Säurefällung: Der Extrakt wird mit 1 M Essigsäure auf pH 5,25 gebracht und 20 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Nach Filtration über Glaswolle wird im Überstand durch Zugabe von festem $KHCO_3$ ein pH- Wert von 6,8 eingestellt.
Ammoniumsulfatfällung: Der Überstand wird pro Liter mit 250 g $(NH_4)_2SO_4$ versetzt (41 % Sättigung), wobei der pH-Wert durch Zugabe von konzentriertem Ammoniak auf 7,0 gehalten wird. Nach 1,5 Stunden Stehen im Kühlraum wird für 30 Minuten bei 15000 x g abzentrifugiert. Das Sediment

wird bei Raumtemperatur in 70- 100 ml Wasser aufgenommen und 2- 3 Stunden gegen 5 l Wasser und anschließend über Nacht gegen 5 l 1 mM Tris/HCl, pH 7,0 dialysiert.
Hitzeschritt: Die Lösung wird mit 1/500 ihres Volumens 15 M ME (verdünnt in ca. 5 ml Wasser) und 1/400 ihres Volumens 0,2 M EDTA, pH 7,0 versetzt und mit 2 M Tris auf pH 8,8 eingestellt. Es wird für eine Stunde bei 38° C erwärmt, dann auf 4° C abgekühlt und anschließend der pH- Wert mit 1 M Essigsäure auf 7,0 eingestellt. Der entstandene Niederschlag wird 15 Minuten bei 30000 x g abzentrifugiert.
Kristallisation: Der Überstand wird mit 1/100 seines Volumens an 1 M Magnesiumacetat und 1/100 seines Volumens an 0,1 M AMP versetzt. Das Enzym kristallisiert über Nacht aus. Am folgenden Tag wird es noch zweimal umkristallisiert. Dazu werden die Kristalle für 15 Minuten bei 30000 x g abzentrifugiert, bei Raumtemperatur in 100 ml 20 mM ME / 10 mM Tris/HCl, pH 7,0 gelöst und ein eventuell aufgetretener Niederschlag denaturierter Proteine abzentrifugiert. Nach Zugabe von Magnesiumacetat und AMP (siehe oben) kristallisiert das Enzym wieder aus.
Lagerung: Das reine Enzym wird AMP- frei gemacht (siehe 2.1.4.c) und über Nacht gegen 50 mM GP / 2 mM EDTA / 1 mM DTE / 50 % Glycerin, pH 7,0 dialysiert, wobei das Enzym stark ankonzentriert wird. Die Phosphorylase b wird mit dem gleichen Puffer auf eine Endkonzentration von ca. 100 mg/ml verdünnt und in dieser Form bei -20° C gelagert.

b) Präparation aus dem Protein- Glycogenkomplex, der bei der Präparation der Phosphorylase Kinase anfällt (JENNISSEN und HEILMEYER, (1975):
Bis auf die beiden ersten Schritte ist diese Präparationsmethode mit der unter 2.1.4.a beschriebenen identisch.
Amylase- Verdauung: Zur Entfernung des Glycogens werden 6 ml Protein- Glycogenkomplex mit einem gleichen Volumen 50 mM GP, pH 7,0 und α- Amylase (Bacillus Subtilis, Boehringer Mannheim) aus einer Stammlösung (5 mg/ml H_2O) bis zu einer Endkonzentration von 0,1 mg/ml versetzt. Darauf wird in einem Potter- Homogenisator homogenisiert und für 10 Minu-

ten bei 30° C inkubiert.

Hydrophobe Chromatographie: Die Probe wird mit einem gleichen Volumen an 20 mM GP / 40 mM ME / 4 mM EDTA / 40 % Sucrose / 10^{-4} M PMSF, pH 7,0 versetzt und anschließend für 10 Minuten bei 15000 x g zentrifugiert. Der Überstand wird auf eine Butylamin- Sepharose 4B- Säule (2 cm Ø x 6,5 cm Gelhöhe, 24 Mol Butylamin/ml Gel) aufgetragen, die mit 10 mM GP / 20 mM ME / 2 mM EDTA / 20 % Sucrose / 0,5 x 10^{-4} M PMSF, pH 7,0 äquilibriert ist. Darauf wird so lange mit dem genannten Puffer gewaschen, bis kein Protein mehr von der Säule eluiert wird. Die Phosphorylase b, die an das Gel adsorbiert ist, wird mit dem Puffer 10 mM GP / 20 mM ME / 2 mM EDTA / 20 % Sucrose / 0,5 x 10^{-4} M PMSF, pH 5,6 eluiert.

In der Reihenfolge Hitzeschritt, Ammoniumsulfatfällung und Kristallisation schließen sich die weiteren Präparationsschritte wie unter 2.1.4.a beschrieben an.

c) Herstellung von AMP- freier Phosphorylase b nach FISCHER und KREBS (1958):

Zur Befreiung der Phosphorylase b von ihrem allosterischen Effektor AMP (zur Kristallisation des Enzyms bei der Präparation zusammen mit Magnesiumacetat zugesetzt) wird die Kristallsuspension für 10 Minuten bei 30000 x g zentrifugiert und das Sediment bei 30° C in möglichst wenig (ca. 1 ml/50 mg Protein) 10 mM GP / 50 mM ME, pH 7,0 aufgenommen. Diese Lösung wird über eine Aktivkohlesäule (ca. 1 g Aktivkohle / 200 mg Protein) gepumpt, die mit dem oben genannten Puffer äquilibriert und eluiert wird. Das Eluat enthält das AMP- freie Enzym. Ein Maß für die Reinheit ist der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm. Bei AMP- freier Phosphorylase b beträgt $A_{260} : A_{280} = 0,52- 0,54$. Die Proteinkonzentration der Lösung wird aus der Extinktion bei 280 nm mit einem Extinktionskoeffizienten von 1,30 cm^2/mg (COHEN et al., 1971) berechnet.

2.1.5. Präparation von sarcoplasmatischem Reticulum nach DE MEIS und HASSELBACH (1971)

Die gesamte Präparation erfolgt bei 4° C.
Extraktion: 500 g des durch den Fleischwolf gedrehten Skelettmuskelfleisches werden mit 1,5 l 0,1 M KCl / 2 mM EDTA / 2,5 mM KH_2PO_4 / 2,5 mM K_2HPO_4 im Homogenisator (Waring-Blendor) 2 Minuten (45 s Stufe "low", 45 s Stufe "medium", 30 s Stufe "high") homogenisiert. Zur Entfernung der Myofibrillen und Mitochondrien wird das Homogenat 20 Minuten bei 17000 x g zentrifugiert.
Differentielle Zentrifugation: Der Überstand (Rohextrakt) wird nach Filtration über Glaswolle mit 2 M Tris auf pH 7,0 eingestellt und 90 Minuten bei 35000 x g zentrifugiert. Das Sediment wird in 160 ml 1M Sucrose / 50 mM KCl, pH 7,0 aufgenommen, homogenisiert (Potter- Homogenisator) und 15 Minuten bei 7000 x g zentrifugiert.
ATP-/KCl-Extraktion: Der Überstand wird über Glaswolle filtriert, 240 ml 1 M KCl / 3,3 mM ATP / 3,3 mM $MgCl_2$, pH 7,0 werden hinzugegeben, und die Suspension wird 90 Minuten bei 100000 x g zentrifugiert. Für alle Zentrifugationsschritte bei 100000 x g werden die Zentrifugenbecher mit je 1 ml Sucrose unterschichtet.
Waschen mit KCl: Das Sediment wird zweimal mit je 100 ml KCl gewaschen. Dazu wird es homogenisiert (Potter- Homogenisator) und 60 Minuten bei 100000 x g zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschen wird das Sediment in 5- 10 ml 0,1 M KCl, pH 7,0 aufgenommen, homogenisiert und bei 0° C aufbewahrt oder lyophilisiert. Das Produkt dieser Präparation wird im weiteren Verlauf dieser Arbeit "rohes" sarcoplasmatisches Reticulum genannt.

2.1.6. Präparation von Glycerinaldehyd- 3- phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) nach CORI et al. (1948)

Die gesamte Präparation erfolgt bei 4° C.
Extraktion: 30 g lyophilisierte Skelettmuskulatur werden mit 360 ml 30 mM KOH / 1 mM EGTA versetzt und für 2 Minuten im Homogenisator (Starmix) homogenisiert. Der viskose Brei wird für 20 Minuten bei 13000 x g abzentrifugiert.

1. $(NH_4)_2SO_4$- Fällung: Pro 100 ml Rohextrakt werden 4,15 ml gesättigter $(NH_4)_2SO_4$- Lösung / 2 mM EDTA, pH 7,4 hinzugegeben, für 20 Minuten auf Eis stehen gelassen und anschließend für weitere 20 Minuten bei 13000 x g abzentrifugiert. Der Niederschlag enthält die Aldolase, die durch Umkristallisation in reiner Form erhalten werden kann.
2. $(NH_4)_2SO_4$- Fällung: Pro 100 ml Überstand werden 13 g festes $(NH_4)_2SO_4$ hinzugesetzt und nach 20 minütigem Stehen auf Eis wieder für 20 Minuten bei 13000 x g abzentrifugiert.
Kristallisation: Nach dem Einstellen des pH- Wertes auf 8,3- 8,4 im Überstand mit konzentriertem Ammoniak kristallisiert das Enzym aus. Ein reines Enzym wird erst nach fünfmaligem Umkristallisieren erhalten. Dazu werden die Kristalle abzentrifugiert, in 20- 40 ml 2 mM EDTA, pH 7,0 aufgenommen und mit dem doppelten Volumen an gesättigter $(NH_4)_2SO_4$- Lösung / 2 mM EDTA, pH 8,5 wieder auskristallisiert.

2.1.7. Präparation von Glycogensynthase nach NIMMO et al. (1976) und CAUDWELL et al. (1978)

Das Ausgangsmaterial dieser Präparation ist das Sediment (Protein- Glycogenkomplex), das beim Ultrazentrifugationslauf (78000 x g) während der Präparation der Phosphorylase Kinase anfällt (siehe 2.1.3.). Der Protein- Glycogenkomplex wird bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C gelagert.
Diese Präparation wird bei 4° C durchgeführt und umfaßt folgende Schritte:
Glycogenverdauung: Da der größte Teil der Glycogensynthase fest an das Glycogen des Protein- Glycogenkomplexes gebunden ist, wird das Glycogen mit Hilfe der endogenen Enzyme Phosphorylase b und "debranching enzyme" abgebaut.
Dazu werden 100 ml Protein- Glycogenkomplex mit 100 ml 50 mM GP, pH 7,0 und 200 ml 1 M KH_2PO_4 / 2 mM EDTA / 30 mM ME / 10 mM AMP / 20 % Glycerin, pH 7,0 versetzt und für 30 Minuten bei 25° C inkubiert. Anschließend wird für 48 Stunden

gegen 4 l 5 mM Tris/HCl / 1 mM EDTA / 15 mM ME / 10 % Glycerin, pH 7,5 dialysiert (dreimaliger Pufferwechsel) und endlich für 90 Minuten bei 78000 x g abzentrifugiert.
Ionenaustauschchromatographie: Der Überstand wird auf eine DEAE- Sephacel- Zellulose- Säule (5 cm Ø x 11 cm Gelhöhe) aufgetragen, die mit 5 mM Tris/HCl / 1 mM EDTA / 15 mM ME / 10 % Glycerin, pH 7,5 äquilibriert ist. Es wird mit 500 ml des gleichen Puffers gewaschen, und anschließend die Glycogensynthase mit Hilfe eines linearen Gradienten von 5 mM- 1 M Tris im gleichen Puffer über 8 Stunden eluiert (Gradientenvolumen ca. 900 ml). Bei einer Konzentration von 300 mM Tris erscheint die Glycogensynthase im Eluat. Sie ist noch bis zu 30 % mit Calsequestrin verunreinigt.
Präparative Elektrophorese: Da die beschriebene Endreinigung durch Gelfiltration über Sephadex G 200 (CAUDWELL et al., 1978) nicht zum Ziel führt, und die Glycogensynthase für die Turnovermessungen nicht in nativer Form isoliert werden muß, wird die Endreinigung über die präparative Elektrophorese(siehe 2.1.12.) vorgenommen. Die Reinigung erfolgt über ein 7 % Polyacrylamid- Trenngel in Gegenwart von SDS.

2.1.8. Präparation von Calsequestrin nach CAUDWELL et al. (1978)

Diese Methode ist mit der Präparationsmethode der Glycogensynthase (siehe 2.1.7.) bis einschließlich der Ionenaustauschchromatographie identisch. Jedoch wird bei diesem Schritt das Calsequestrin nach der Glycogensynthase bei einer Triskonzentration von ca. 550 mM von der DEAE- Sephacel- Zellulose- Säule eluiert. Die Endreinigung (Kontamination mit bis zu 40 % Glycogensynthase) erfolgt auch hier durch präparative Elektrophorese über ein 7 % Polyacrylamid- Trenngel in Gegenwart von SDS (siehe 2.1.12.).

2.1.9. Isolierung der σ- Untereinheit der Phosphorylase Kinase nach COHEN et al. (1978)

Phosphorylase Kinase wird 3- 4 Minuten auf dem kochenden Wasserbad erwärmt. Dabei steigt die Temperatur in der Probe auf ca. 90° C. Anschließend wird für 15 Minuten auf Eis abgekühlt und dann bei 15000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Im Überstand befindet sich fast ausschließlich die δ- Untereinheit. Das Sediment, das die übrigen drei Untereinheiten enthält, wird später aufgearbeitet.
Der Überstand wird zur weiteren Reinigung der δ- Untereinheit auf eine DEAE- Sephadex A 25 Säule (2 cm Ø x 15 cm Gelhöhe) aufgetragen, die mit 0,2 M NH_4Cl / 50 mM GP / 1 mM EDTA, pH 7,0 äquilibriert ist. Anschließend wird mit dem gleichen Puffer nachgewaschen. Die δ- Untereinheit wird durch Erhöhung der NH_4Cl- Konzentration auf 0,6 M im gleichen Puffer eluiert.
Die Fraktionen, welche die δ- Untereinheit enthalten, werden vereinigt und über ein Amicon PM 10 Filter auf ca. 1 ml ankonzentriert. Zur Endreinigung dieser Untereinheit wird diese Probe über eine Sephacryl S 300 Säule (1,5 cm Ø x 64 cm Gelhöhe) gegeben, die mit 50 mM GP / 0,2 M NH_4Cl / 1 mM EGTA, pH 7,0 äquilibriert und eluiert wird.

2.1.10. Isolierung der γ- Untereinheit der Phosphorylase Kinase nach COHEN (1973), modifiziert

Das bei der Präparation der δ- Untereinheit angefallene Präzipitat nach Hitzedenaturierung der Phosphorylase Kinase (siehe 2.1.9.) wird in 1 % ME / 1 % SDS aufgelöst und für 5 Minuten auf 100° C erwärmt. Die Menge des Lösungsmittels wird so bestimmt, daß im Ansatz gewichtsmäßig gleiche Mengen an SDS und Protein vorhanden sind.
Nach dem Abkühlen wird auf einem Amicon PM 10 Filter auf ca. 2 ml ankonzentriert und über eine Sephadex G 200 Säule (2 cm Ø x 98 cm Gelhöhe) gelfiltriert, die mit 10 mM NaH_2PO_4 / 1 mM DTE / 0,05 % NaN_3 / 0,1 % SDS / 1 mM EGTA / 10^{-4} M PMSF, pH 6,4 äquilibriert und eluiert wird.
Da die γ- Untereinheit nach dieser ersten Gelfiltration noch durch die beiden anderen Untereinheiten α und β verunreinigt ist, werden die Fraktionen mit der fast sauberen

γ- Untereinheit zusammengegeben, auf einem Amicon PM 10 Filter auf ca. 2 ml ankonzentriert und einer Rechromatographie unter identischen Bedingungen unterzogen.

2.1.11. Isolierung der Ca^{2+}- Transport- ATPase aus sarcoplasmatischen Reticulum nach HÖRL et al. (1978)

60 mg lyophilisiertes "rohes" sarcoplasmatisches Reticulum (siehe 2.1.5.) werden zur Entfernung von Phosphorylase b und anderen löslichen Proteinen in 4 ml 50 mM Tris/HCl / 1 mM DTE / 20 % Sucrose, pH 7,0 aufgenommen und bei 11000 x g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wird erneut in 4 ml des gleichen Puffers aufgenommen und unter gleichen Bedingungen abzentrifugiert. Nach einer dritten Wiederholung dieses Vorganges wird das verbliebene Sediment in 1 ml des oben genannten Puffers aufgenommen. Es werden 20 l 14 M ME und 0,5 ml 10 % SDS hinzugegeben und für 10 Minuten auf 100° C erwärmt. Anschließend wird die Probe über Sephadex G 200 (2 cm Ø x 98 cm Gelhöhe) gelfiltriert. Diese Säule wird mit 10 mM NaH_2PO_4 / 0,1 % SDS / 1 mM DTE / 1 mM EGTA / 0,05 % NaN_3 / 10^{-4} M PMSF, pH 6,4 äquilibriert und eluiert. Durch diese Gelfiltration wird das sarcoplasmatische Reticulum grob in drei Komponenten zerlegt:
a) MG 100000, b) MG 50000- 60000, c) MG 30000. Die erste Komponente ist die ATPase, die aber zur völligen Reinigung noch einer präparativen Elektrophorese (siehe 2.1.12.) unterzogen werden muß (7 % Polyacrylamid- Trenngel).
Auch die beiden anderen Komponenten - das Calsequestrin und die "acidic proteins" - können nach Reinigung über die präparative Elektrophorese in homogener Form gewonnen werden.

2.1.12. Präparative Trennungen von SDS- denaturierten Proteinen mit der präparativen Polyacrylamid- Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS

In einer Colora Ultraphor- Elektrophorese werden die prä-

parativ elektrophoretischen Trennungen von SDS- denaturierten Polypeptiden mittels des diskontinuierlichen Neville-Gelsystems (NEVILLE, 1971) durchgeführt. Dieses Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammelgel (3 % Polyacrylamid) und einem Trenngel. Letzteres enthält abhängig von der Größe der Molekulargewichte der zu trennenden Polypeptide verschieden hohe Polyacrylamidkonzentrationen:

Polyacrylamidkonzentration im Trenngel	Molekulargewicht der zu trennenden Proteine
5,5 %	> 100000
7,0 %	50000- 100000
10,0 %	< 50000

Diese Gele werden durch das Zusammenpipettieren von Stammlösungen folgendermaßen hergestellt:

Stammlösung	Sammelgel 3 %	Trenngel 5,5 %	Trenngel 7 %	Trenngel 10 %
A 30 % Acrylamid 0,6 % Bisacrylamid	2 ml	7,26 ml	9,24 ml	13,2 ml
B 0,108 M Tris/H_2SO_4 pH 6,1	10 ml	- - -	- - -	- - -
C 0,850 M Tris/HCL pH 9,18	- - -	20 ml	20 ml	20 ml
D TEMED	20 µl	40 µl	40 µl	40 µl
H_2O	7 ml	10,74 ml	8,76 ml	4,8 ml
E Ammoniumperoxidisulfat (60 mg/ml)	1 ml	2 ml	2 ml	2 ml

Die Stammlösungen A- D und das H_2O werden zusammengegeben, es wird unter Wasserstrahlvacuum entgast und anschließend die Stammlösung E zum Start der Polymerisation hinzugegeben. Zuerst werden die 40 ml Trenngel in eine Gelkammer (0,75 cm x 14 cm Grundfläche), die auf einem waagerecht ausgerichteten Tischchen steht, gegossen und mit Wasser überschichtet.

Nach der Polymerisation wird das Wasser abgegossen, 10 ml Sammelgel über das Trenngel gegeben und wieder mit Wasser überschichtet. Nach dem Erstarren dieses Gels wird die Gelkammer in die Ultraphor- Elektrophorese eingesetzt. Unterhalb des Trenngels befindet sich jetzt die Elutionskammer, durch welche der Elutionspuffer, bestehend aus 425 mM Tris/HCl / 1 mM EGTA, pH 9,18, mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 36 ml/h gepumpt wird. Die so eluierten Polypeptide werden über einen Fraktionssammler mit Photometer aufgefangen.
Unterhalb der Elutionskammer —von dieser durch eine Dialysemembran getrennt— befindet sich die "Gegenkammer", die von 850 mM Tris/HCl / 1 mM EGTA, pH 9,18 durchströmt wird. Mit dieser Anordnung wird ein Spannungsabfall erzeugt, der die in die Elutionskammer gelangenden Proteine ankonzentriert, so daß sie quantitativ eluiert werden können.
Nach dem Aufpumpen der Probe auf das Sammelgel, welche in 4- 8 ml Probenpuffer (108 mM Tris/H_2SO_4 / 1 % SDS / 3 mM DTE / 10 % Glycerin / 0,002 % Bromphenolblau, pH 6,1) gelöst ist, wird zunächst eine Stromstärke von 30 mA eingestellt, bis die Probe in das Sammelgel eingewandert ist. Die eigentliche Trennung wird anschließend bei einer konstanten Stromstärke von 90 mA durchgeführt.
Der Anodenpuffer besteht aus 425 mM Tris/HCl, pH 9,18, der Kathodenpuffer setzt sich zusammen aus 0,04 M Borsäure / 41 mM Tris / 0,1 % SDS, pH 6,8. Während des Elektrophoreselaufes wird die Temperatur des Polyacrylamidgeles durch einen Kryomaten bei 10° C konstant gehalten.

2.1.13. Präparative Trennungen von Aminosäuren und Peptiden mit der Hochspannungselektrophorese (CLOTTEN und CLOTTEN, 1962)

Die elektrophoretische Auftrennung von Aminosäuren und Peptiden aus Rohextrakten und Seren wird in einer Gilson Hochspannungselektrophorese (Modell D) auf einem Papierstreifen mit den Abmessungen 58 cm x 56 cm (MN 2827, Macherey,

Nagel + Co.) durchgeführt. Vor dem Befeuchten des Papierstreifens mit dem Elektrodenpuffer, bestehend aus 2,5 % Ameisensäure / 7,8 % Essigsäure, pH 1,85, wird in der Mitte des Elektrophoresepapiers mit einem weichen Bleistift der Startstrich für den Probenauftrag gezogen. Damit das Papier gleichmäßig und nicht zu stark mit dem Elektrodenpuffer durchtränkt ist, wird es anschließend zwischen 2 anderen Elektrophoresepapieren mit einer Walze gepreßt.
Die Probe, die nach der vorhergegangenen Gelfiltration über Sephadex G 10 (siehe 4.1.4.) im Wasserstrahlvacuum zur Trockene eingedampft worden ist, wird in 1 ml des Elektroden- und Trägerpuffers aufgenommen. Sie wird mit einer Eppendorfpipette (50 µl) in möglichst kleinen Tropfen auf den Startstrich aufgetragen. Links und rechts der Probe wird als Referenzsubstanz Leucin (ca. 0,2 mg Leu gelöst in 20 µl Elektrodenpuffer) aufgetragen. Anschließend wird der Papierstreifen auf ein bockförmiges Gestell gespannt und so in die Hochspannungselektrophoresekammer gestellt, daß die beiden Papierenden ca. 1,5 cm tief in die Elektrodenpuffer (Gesamtmenge 32 l) eintauchen. Das Elektrophoresepapier wird durch ein Esso- Varsol- Kühlbad (Gesamtmenge ca. 89 l, Minerol- Müller KG, Bochum) auf einer Temperatur von 5- 10° C gehalten. Die Elektrophorese wird über eine Stunde bei einer Spannung von 35 V/cm (Stromstärke 175 mA) durchgeführt. Anschließend wird das Elektrophoresepapier im Trockenschrank bei 60° C getrocknet und das Leucin (nur die Referenzsubstanz) mit Ninhydrin- Sprühreagenz sichtbar gemacht. Unter den geschilderten Bedingungen beträgt der Rf- Wert für das Leucin 0,38.
Um den gewünschten Teil der Probe herauszulösen, wird der ca. 2 cm breite Streifen des Papiers, der das Leucin und gleich schnell laufende Komponenten enthält, ausgeschnitten und an einen gleichartigen, unbenutzten geheftet. Ein Teil des letzteren wird so in ein mit Wasser gefülltes Becherglas getaucht, daß der die Probe enthaltende Teil des Streifens außerhalb des Becherglases nach unten hängt. Durch Kapillar- und Heberkräfte wird das Wasser durch den gesamten Streifen gezogen, löst die Probe und tropft dann in

eine Vorlage. Diese Elution erfolgt in einer feuchten Kammer (Eksikator), da anderenfalls das Wasser im Papierstreifen verdunsten würde. Nach 1,5 Tagen (Elutionsvolumen ca. 100 ml) wird die Elution abgebrochen, da keine weitere Radioaktivität (^{3}H- Leucin) mehr eluiert wird.
Die Endreinigung des Leucins erfolgt über die präparative Aminosäureanalyse (siehe 4.1.4.).

2.1.14. Herstellung von Butylamin- substituierter Sepharose 4B nach CUATRECASAS (1970) und JENNISSEN und HEILMEYER (1975)

50 g trockene Sepharose 4B werden auf einem Büchnertrichter mit 2 l H_2O gewaschen und anschließend trocken gesaugt. Zu der Sepharose 4B werden 22 ml H_2O, 37,4 ml H_2O freies Dioxan und 48 ml 2,5 M Phosphatpuffer (1,8 M K_3PO_4 / 0,8 M K_2HPO_4, pH 12,0) gegeben. Darauf wird die Reaktion durch Zugabe von 2,6 ml BrCN- Lösung (Endkonzentration: 20 mg/ml BrCN im Ansatz) gestartet. Das BrCN wird in wasserfreiem Dioxan gelöst; ein eventuell auftretender Niederschlag wird abfiltriert. Der BrCN- Gehalt der Stammlösung wird jodometrisch bestimmt. Der pH- Wert von 12 und die Reaktionstemperatur von 6- 8° C sollen während der Aktivierung der Sepharose konstant gehalten werden.
Nach einer Kopplungszeit von 12 Minuten wird über einem Büchnertrichter abgesaugt und sofort mit 1,5 l 0,1 M GP, pH 7,0 nachgewaschen. Zur Kopplung des Amins wird die Sepharose mit 100 ml 2 M Butylamin, pH 10,0 (^{14}C- markiert, ca. 0,25 µCi/ml) versetzt. Der gesamte Vorgang des Waschens und Einbringens der Sepharose in die Butylaminlösung soll nicht länger als 90 Sekunden dauern.
Zur Kopplung wird die Sepharose darauf unter Rühren 3 Stunden im Kühlraum inkubiert. Anschließend wird über einen Büchnertrichter mit 400 ml 0,01 M NaOH, 400 ml 0,01 M HCl und 400 ml H_2O gewaschen. Schließlich wird die substituierte Sepharose in 50 ml 10 mM GP / 0,01 mg/ml NaN_3, pH 7,0 im Kühlraum gelagert.

2.1.15. Immunisierung von Schafen mit den isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase (HÖRL et al., 1978)

Die Untereinheiten α, β und γ werden vor der Immunisierung zur Entfernung des SDS gegen 0,1 % Triton- X 100 dialysiert, nachdem auch im Dialyseschlauch eine Konzentration von 0,1 % Triton- X 100 eingestellt worden ist.
Die δ - Untereinheit, die in Abwesenheit von SDS isoliert worden ist, wird gegen 50 mM GP, pH 7,0 dialysiert.
Für jede Untereinheit wird ein Schaf (männliches Texel Schaf, ca. 50 kg) durch intramuskuläre Injektion abwechselnd in die Hinterläufe mit der gereinigten Untereinheit immunisiert. Bei jeder Injektion werden pro 1 kg Lebendgewicht 50 µg Untereinheit (2,5 mg Protein gelöst in 1 ml 0,1 % Triton- X 100 plus 1 ml komplettes Freundsches Adjuvans) gespritzt. Nach der ersten Immunisierung werden weitere Injektionen an den Tagen 8, 15, 36, 43 und 71 nach Erstimmunisierung vorgenommen. Vor jeder dieser Injektionen werden 50 ml Blut entnommen, die auf Antikörperbildung untersucht werden. An den Tagen 57, 64, 85, 92 und 99 nach Erstimmunisierung werden jeweils 500 ml Blut entnommen.

2.1.16. Aufarbeitung antikörperhaltiger Seren (STEFFEN, 1968)

Nach der Blutentnahme werden die Antikörperlösungen entweder als Serum oder zum Teil als Citratplasma gewonnen.
Gewinnung von "dialysierter Antikörperlösung": Ein Teil des antikörperhaltigen Serums wird für 2 Tage gegen die 20fache Menge destillierten Wassers (einmaliger Wechsel) bei 4° C dialysiert. Die dabei ausfallenden Euglobuline werden durch Zentrifugation bei 15000 x g für 15 Minuten abgetrennt. Die so erhaltene antikörperhaltige Lösung wird im Laufe dieser Arbeit als "dialysierte Antikörperlösung" bezeichnet. Es konnten keine immunologischen Unterschiede zwischen dem dialysierten Serum und Plasma gefunden werden.

Gewinnung der γ-_Globulinfraktion: Der andere Teil des antikörperhaltigen Serums wird mit dem gleichen Volumen von 3,5 M $(NH_4)_2SO_4$, pH 7,0 versetzt und für 20 Minuten auf Eis gestellt. Die gefällten γ- Globuline werden abzentrifugiert (15 Minuten bei 15000 x g), in Wasser aufgenommen und zur Entfernung des $(NH_4)_2SO_4$ für 2 Tage gegen die 20fache Menge destillierten Wassers dialysiert. Eventuell ausfallende Proteine (Euglobuline) werden abzentrifugiert. Die so erhaltene Antikörperlösung wird im Laufe dieser Arbeit als $(NH_4)_2SO_4$- gefällte Antikörperlösung bezeichnet. Mit ihr werden fast alle immunbiochemischen Untersuchungen durchgeführt.
Die antikörperhaltigen Lösungen werden bei -20° C gelagert. Die Proteinkonzentration beträgt zwischen 50 und 60 mg/ml.

2.1.17. Immunfluoreszenz von Gewebe durch Fluoreszeinisothiocyanat markierten Antikörpern nach STERNBERGER (1974) und GRÖSCHEL- STEWART (1971)

Zu der Antikörperlösung (γ- Globulinfraktion oder spezifisch gereinigte Antikörper) wird 1/10 Volumen 0,5 M Carbonatbicarbonatpuffer, pH 9,5 und 0,01 mg FITC (Sigma) / 1 mg Protein gegeben und für 4 Stunden bei 0° C inkubiert. Anschließend wird überschüssiger Farbstoff durch Gelfiltration über Sephadex G 25 (1,5 cm Ø x 10 cm Gelhöhe) bei Raumtemperatur abgetrennt. Diese Säule wird mit 50 mM GP, pH 7,0 äquilibriert und eluiert. Die markierten Antikörper erscheinen im Ausschlußvolumen der Säule, während der freie Farbstoff wesentlich hinter dem Totalvolumen der Säule eluiert wird, da er von dem Gel adsorbiert wird. Das Kopplungsverhältnis von Protein zu FITC wird nach Messung der Extinktion in der Probe bei 493 nm und 276 nm mittels eines Nomogramms nach WELLS et al. (1968) bestimmt. Unter den beschriebenen Bedingungen und unter der Voraussetzung, daß sämtliches eingesetztes Protein γ- Globuline sind, werden pro Antikörpermolekül 1- 2 Moleküle FITC gebunden.

Zur Vermeidung unspezifischer Anfärbung der Gewebeschnitte werden die markierten Antikörper an Leber- Aceton- Trockenpulver voradsorbiert. Dazu wird auf 1 ml FITC- Antikörperlösung 15 mg Trockenpulver gegeben, 15 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt, 5 Minuten in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert und anschließend durch ein Millipore- Filter (0,45 µm Porendurchmesser) gepreßt.
Die zu untersuchenden Gewebe werden tiefgefroren und mit einem Mikrotom geschnitten. Der Gewebeschnitt wird auf einem Objektträger mit dem gekoppelten Antikörper für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 50 mM GP, pH 7,0 dreimal für je 15 Minuten gewaschen, getrocknet und in wasserfreiem Glycerin eingebettet. Anschließend werden die gefärbten Gewebeschnitte unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet und photographiert.

2.1.18. Carboxymethylierung freier -SH Gruppen in Proteinen nach BUTLER et al. (1969)

Um bei Proteinen die Bildung von Aggregaten über Disulfidbrücken zu verhindern, werden die freien -SH Gruppen carboxymethyliert.
Die Proteinlösung (ca. 0,5 mg Protein gelöst in 1 ml 0,01 % SDS) wird über Nacht gegen 1 mM Na_2HPO_4 / 100 mM NaCl / 0,1 % SDS, pH 8,1 bei Raumtemperatur dialysiert. Anschließend wird die Probe zum Entfernen von gelöstem Sauerstoff für 10 Minuten mit Stickstoff durchperlt. Pro 1 ml Proteinlösung werden dann 2,5 µMol DTE hinzugegeben und für 2 Stunden unter Sauerstoffausschluß bei Raumtemperatur inkubiert.
Jodessigsäure (10 µMol/ml Proteinlösung) wird in 1 ml des oben genannten Puffers gelöst, für 10 Minuten mit Stickstoff durchperlt, zu der reduzierten Proteinlösung gegeben und für weitere 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wird die Reaktion durch Zugabe von 10 µMol ME/ml Proteinlösung abgestoppt. Niedermolekulare Nebenprodukte werden durch Dialyse gegen 1 mM Na_2HPO_4 / 100 mM NaCl / 0,1 % SDS, pH 9,0 entfernt.

2.2. Analytische Methoden

2.2.1. Bestimmung der Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase im automatisierten Test nach JENNISSEN und HEILMEYER (1974)

Die Übertragung der terminalen Phosphatgruppe des ATP auf Phosphorylase b wird über die synchron dazu verlaufende Zunahme der Phosphorylase a- Aktivität verfolgt.
Die Inkubation erfolgt bei 30° C während des Durchpumpens durch ein Schlauchsystem des Technicon Auto- Analyzers.
Es werden gleiche Volumina vermischt von: 1) 3 mM ATP / 20 mM Magnesiumacetat / 0,3 mM $CaCl_2$ / 125 mM Tris / 125 mM GP / 40 mM ME / 0,01 % Triton- X 100, pH 6,8 bzw. 8,2; 2) 5 mg/ml Phosphorylase b (AMP- frei) / 3 % Glycogen / 0,01 % Triton- X 100 / 25 mM ME / 10 mM GP, pH 7,0; 3) Enzymprobe (verdünnt in 10 mM GP / 1 mM DTE / 5 mg/ml Rinderserumalbumin (Serva) / 0,01 % NaN_3, pH 6,8).
Nach 5 Minuten wird die Reaktion durch ca. 100faches Verdünnen mit 100 mM Natriummaleat / 100 mM NaF / 1 mM EDTA / 10 mM ME / 0,05 % NaN_3 / 0,01 % Triton- X 100, pH 6,8 abgestoppt. Von der verdünnten Reaktionsmischung wird ein Aliquot gezogen und in das Schlauchsystem für die Durchführung der Phosphorylase a- Aktivitätsbestimmung (siehe 2.2.2.) geleitet. Die Eichung erfolgt mit Phosphatstandardlösungen; der Extinktion von 1 mM Phosphatlösung in diesem Test entspricht einer Phosphorylase Kinase- Aktivität von 11,6 pkat/ml (pH 6,8) bzw. 26,0 pkat/ml (pH 8,2).

2.2.2. Bestimmung der Enzymaktivität der Glycogen- Phosphorylase im automatisierten Test nach HASCHKE und HEILMEYER (1972)

Die Enzymreaktion verläuft unter Testbedingungen in Richtung des Glycogen- Aufbaus, die Konzentration des freigesetzten Phosphates wird gemessen.
Dazu werden im Schlauchsystem des Technicon Auto- Analyzers gleiche Volumina der Enzymprobe (verdünnt in 10 mM GP /

50 mM ME / 5 mg/ml Rinderserumalbumin / 0,01 % NaN_3, pH 6,8) und der Substratlösung vermischt und ca. 10 Minuten bei 30° C inkubiert. Für den Phosphorylase a- Test enthält die Substratlösung 100 mM Natriummaleat / 150 mM Glucose- 1- Phosphat / 2 % AMP- freies Glycogen / 0,01 % Triton- X 100, pH 6,8. Für den Phosphorylase b- Test enthält sie zusätzlich 2 mM AMP. Die Enzymreaktion wird durch Verdünnen in ca. 45fachem Überschuß an 0,28 % Ammoniumheptamolybdat / 0,01 % SDS / 0,55 N H_2SO_4 gestoppt. Nach Zusatz von einem Zwanzigstel des Volumens an 0,125 % 1- Amino-, 2- hydroxinaphthalin-4- sulfonsäure / 7,44 % $NaHSO_3$ / 0,25 % Na_2SO_3 wird nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur im Durchflußphotometer die Extinktion bei 660 nM gemessen. Der Extinktion von 1 mM Phosphatlösung im Test entspricht einer Enzymaktivität von 2,21 µkat/ml.

2.2.3. Bestimmung der Enzymaktivität der ATPase des sarcoplasmatischen Reticulum nach HASSELBACH (1966)

Diese Methode beruht auf der Konzentrationsmessung des in der Enzymreaktion freigesetzten Phosphates.
Zu 1,8 ml 55,6 mM Imidazol / 111 mM KCl / 5,56 mM $MgCl_2$ / 1,67 mM EGTA, pH 7,0 werden 0,1 ml SR- Suspension (ca. 0,25 mg Proteinendkonzentration in 100 mM KCl) gegeben und auf 30° C temperiert. Durch Zusatz von 0,1 ml 100 mM ATP, pH 7,0 wird die Reaktion gestartet. Nach 0,5, 1, 2, 4, 5,5, 6, 6,5, 7,5, 8, 8,5 und 9 Minuten werden Proben von 0,2 ml entnommen und jeweils zum Abstoppen der Enzymreaktion zu 0,4 ml 10 % SDS gegeben. Unabhängig von der Probenentnahme werden 5 Minuten nach dem Starten der Reaktion 0,02 ml 100 mM $CaCl_2$, pH 7,0 und 7 Minuten nach Start 0,02 ml 200 mM Kaliumoxalat hinzugegeben.
Die Bestimmung der Phosphatkonzentration erfolgt anschließend wie unter 2.2.6. beschrieben. Aus der Zunahme der Phosphatkonzentration pro Zeiteinheit werden im gleichen Testansatz nacheinander folgende 3 ATPase- Aktivitäten berechnet: bei 10 nM Ca^{2+}, bei 1 µM Ca^{2+} sowie in Gegenwart von 4 mM Oxalat.

2.2.4. Bestimmung der Enzymaktivität der Glycogensynthase nach THOMAS et al. (1968)

Für diesen Test werden folgende Reagenzien benötigt:
1. Stammlösung: 3,75 mM ^{3}H- UDP- Glucose
21,2 mg UDP- Glucose, auf 10 ml H_2O + 0,1 ml ^{3}H- UDP- Glucose (Uridindiphospho- D- [6- ^{3}H]- Glucose Ammoniumsalz in 50 % wäßriger C_2H_5OH- Lösung, 3,1 Ci/mMol, 679,4 µCi/ml)
2. Stammlösung: Bestimmung der D- und der I- Form
4 ml 10 % Glycogen + 4 ml 625 mM Tris/HCl / 12,5 mM EDTA / 156 mM $MgCl_2$, pH 7,6 + 2 ml 62,5 mM Glucose- 6- Phosphat
3. Stammlösung: Bestimmung der I- Form:
4 ml 10 % Glycogen + 4 ml 62,5 mM Tris/HCl / 12,5 mM EDTA / 156 mM $MgCl_2$, pH 7,6 + 2 ml H_2O
Für den Testansatz werden 100 µl ^{3}H- UDP- Glucose mit 50 µl Probe und 20 µl Stammlösung 2 bzw. 3 bei 30° C inkubiert. Nach 5, 10 und 15 Minuten wird jeweils ein Aliquot von 50 l auf ein Whatman- Filterplättchen gegeben. Darauf werden die Plättchen für 20 Minuten in 66 % Äthanol, danach für 10 Minuten in frischer 66 %iger Äthanollösung und endlich für 5 Minuten in Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen der Plättchen im Trockenschrank bei 60° C werden sie in Szintillationsgläschen gegeben und mit je 5 ml Toluol- Szintillator versetzt.
Der Leerwert (cpm_o) wird durch das Messen eines leeren Plättchens, das in die Waschflüssigkeit getaucht worden ist, ermittelt. Zur Bestimmung des Totalwertes (cpm_{total}) werden 50 µl ^{3}H- UDP- Glucose auf ein Filterplättchen gegeben.
Die Enzymaktivität der Glycogensynthase läßt sich anschließend durch folgende Formel errechnen:

$$\text{Einheiten Synthase/ml} = \frac{\text{cpm (Plättchen) x 3,4 x 20}}{\text{t x spez. Rad. UDP- G (Totalwert 1 nM)}}$$

2.2.5. Bestimmung der Proteinkonzentration im automatisierten Test nach LOWRY et al. (1951)

Enthält die Probelösung die Bestimmungsmethode störende Sub-

stanzen (reduzierende Agenzien wie ME oder DTE), so wird das Protein vor der Bestimmung mit 10 % Trichloressigsäure (Endkonzentration 5 %) gefällt, nach zehnminütigem Stehen auf Eis in einer Tischzentrifuge für 15 Minuten abzentrifugiert und in 1 % SDS / 0,1 N NaOH aufgenommen. Die Durchführung des Proteintestes erfolgt im Technicon Auto- Analyzer bei Raumtemperatur. Ein Aliquot der Probe wird mit einem gleichen Volumen 0,1 % $CuSO_4$ x 5 H_2O / 0,24 % Dinatriumtartrat x 2 H_2O, pH 7,0 vermischt. Nach einer Minute erfolgt der Zusatz eines 4,25fachen Volumens an 0,2 N NaOH / 2,12 % Na_2CO_3, nach einer weiteren Minute der Zusatz eines gleichen Volumens an Folin- Ciocalteau- Reagenz (Merck, 1 : 4 mit H_2O verdünnt). Nach 5 Minuten Inkubation wird die Extinktion bei 660 nm bestimmt. Die Eichung des Testes erfolgt mit Rinderserumalbumin- Standardlösungen (50, 100, 150 µg/ml).

2.2.6. Bestimmung der Phosphatkonzentration im automatisierten Test nach FISKE und SUBBAROW (1925)

Im Schlauchsystem des Technicon Auto- Analyzers werden 0,01 % SDS / 0,27 % Ammoniumheptamolybdat / 0,55 N H_2SO_4 ("Stop-Lösung") und 7,44 % $NaHSO_3$ / 0,25 % Na_2SO_3 / 1,25 % 1- Amino-, 2- hydroxinaphthalin- 4- sulfonsäure ("ANSA- Reagenz") im Volumenverhältnis 1 : 6 ca. 2 Minuten lang gemischt. Darauf erfolgt die Zugabe der Probe (0,2 ml, verdünnt in 7,5 % SDS) im Volumenverhältnis 1 : 4,15 zur Reagenzienmischung, und nach weiteren 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wird im Durchflußphotometer die Extinktion bei 660 nm gemessen. Die Eichung erfolgt mit Phosphatstandardlösungen.

2.2.7. Polyacrylamid- Gelelektrophorese in Gegenwart von SDS

a) Verfahren nach WEBER und OSBORN (1969):

Stammlösungen:

A) 22,2 % Acrylamid / 0,6 % Methylen- bis- Acrylamid

B) 57 mM NaH_2PO_4 / 145 mM Na_2HPO_4 / 0,2 % SDS

C) N,N,N',N'- Tetramethylendiamin (TEMED)

D) 15 mg/ml Ammoniumperoxidisulfat (stets frisch ansetzen).
Folgende Volumina der Stammlösungen werden zusammenpipettiert

	für 5 % Gel	für 10 % Gel
A)	4,5 ml	9,0 ml
B)	10,0 ml	10,0 ml
C)	20 µl	20 µl
D)	1,0 ml	1,0 ml
H_2O	4,5 ml	0,0 ml

Die Lösungen A), B), C) und H_2O werden zusammenpipettiert und in einer Saugflasche unter Wasserstrahlvacuum entgast. Zum Start der Polymerisation wird Lösung D) hinzugegeben und das Gemisch in Gelröhrchen gegossen. Die Proteinproben (5- 10 µg Protein pro Bande) werden in 0,05 ml Probenpuffer (28,5 mM NaH_2PO_4 / 72,25 mM Na_2HPO_4 / 1 % SDS / 0,002 % Bromphenolblau / 10 % Glycerin / 150 mM ME, pH 7,2) gemischt und 5 Minuten gekocht. Die Anoden- und Kathodenkammer werden mit je einem Liter Kammerpuffer (28,5 mM NaH_2PO_4 / 72,25 mM Na_2HPO_4 / 0,1 % SDS) gefüllt und die Probe (max. 0,05 ml) auf die polymerisierten Gele aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei einer Stromstärke von 8 mA pro Gel durchgeführt. Anschließend werden die Gele mit 0,25 % Coomassie-Brilliant- Blue (gelöst in 9 % Essigsäure / 45 % Methanol / 46 % H_2O) eine Stunde gefärbt und anschließend in 7,5 % Essigsäure / 5 % Methanol / 87,5 % H_2O unter mehrmaligem Wechsel der Lösung entfärbt.

b) Verfahren nach COHEN (1973):
Die Stammlösungen sind die gleichen wie für die Methode a), nur enthält Stammlösung B) 0,5 % SDS. Der Kammerpuffer hat die Zusammensetzung: 14,25 mM NaH_2PO_4 / 36,1 mM Na_2HPO_4 / 0,1 % SDS. Das weitere Vorgehen erfolgt wie unter a) beschrieben.

c) Verfahren nach PORZIO und PEARSON (1977):
Für 10 % Polyacrylamid- Gele wird zusammenpipettiert:
A) 10 ml 25 % Acrylamid / 0,25 % Methylen- bis- Acrylamid
B) 5 ml 0,5 M Tris / 1,5 M Glycin, pH 8,8

C) 2,5 ml 50 % Glycerin
D) 1 ml 2,5 % SDS / 2,5 mM EDTA
E) 0,01 ml TEMED
F) 4,5 ml H_2O
G) 1 ml 10 mg/ml Ammoniumperoxidisulfat (stets frisch ansetzen)

Die Lösungen A)- F) werden zusammengegeben und in einer Saugflasche unter Wasserstrahlvacuum entgast. Zum Start der Polymerisation wird die Lösung G) hinzugefügt und das Gemisch in Gelröhrchen gegossen. Jedes Gel wird mit 0,025 ml 400 mM Tris/Glycin / 0,04 % TEMED / 0,1 % SDS / 0,004 % Ammoniumperoxidisulfat, pH 8,8 überschichtet. Nach beendeter Polymerisation (ca. 30 Minuten) wird die Lösung abdekantiert. Die Proben (5- 30 µg Protein pro Bande) werden mit 0,5 ml Probenpuffer (50 mM Tris/Glycin / 1 % SDS / 1 mM DTE / 21 % Glycerin / 0,002 % Bromphenolblau, pH 8,8) versetzt und für 5 Minuten auf 100° C erwärmt. Die Anoden- und Kathodenkammer werden mit je einem Liter Kammerpuffer (200 mM Tris/Glycin / 0,1 % SDS, pH 8,8) gefüllt und die Proben auf die polymerisierten Gele aufgetragen. Die Stromstärke wird während des Einwanderns der Probe in das Gel auf 0,5 mA, danach auf 1 mA pro Gel eingestellt. Das Färben und Entfärben der Gele erfolgt wie unter a) beschrieben.

2.2.8. Quantitative Auswertung von SDS- Elektrophorese-Gelen

Zur Messung der relativen Proteinmengen verschiedener Banden auf angefärbten Polyacrylamid- Gelen werden diese mit einem Zeiss- Photometer PMQ II, ausgerüstet mit einem Densitometrier- Zusatzgerät ZK 4 mit Integrator, der Länge nach bei 550 nm photometriert.

2.2.9. Angaben zur Radioaktivitätsmessung

Die Bestimmung der Strahlungsintensität radioaktiver Proben wird in einem Flüssigkeits- Szintillationszähler (Packard,

Modell 2450) in folgender Szintillationslösung durchgeführt: 24 g Permablend (21,84 g 2,5- Diphenyloxazol / 2,16 g 1,4-Di- (2- methylstyryl)- Benzol gelöst in in 2 l Toluol und 1 l Triton- X 100.

a) Messung der ^{3}H- markierten Proben:
15 ml Szintillationsflüssigkeit und 1,5 ml Probe (gelöst in 0,01 % SDS) werden in gläserne Szintillationsgläschen pipettiert und gemessen. Die Zählausbeute wird anschließend durch Zugabe eines internen Standards (8 µl n- [1,2(n)-^{3}H]-Hexadekan, 2,17 µCi/g, Amersham) bestimmt. Unter den beschriebenen Bedingungen liegen die Zählausbeuten bei ca. 35 %.

b) Messung der ^{3}H/^{14}C- markierten Proben:
Die Strahlungsintensitäten dieser beiden Isotope werden nebeneinander mit Hilfe des Zusatzgerätes 2409 gemessen. 21 % der Strahlung des ^{14}C- Isotops werden dabei im ^{3}H- Kanal mitgezählt, wogegen keine Beeinflussung des ^{14}C- Kanals durch die Strahlung des ^{3}H- Isotops eintritt.
Um die Meßergebnisse der verschiedenen Proben miteinander vergleichen zu können, wird für jedes Isotop eine Quenchkurve aufgenommen.

2.2.10. Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung von Proteinen

Die Proteine (gelöst in 0,01 % SDS) werden gefriergetrocknet und anschließend in 6 N HCl bei 110° C im Ölbad hydrolysiert (24, 48 und 96 Stunden). Bei dieser Methode werden die Aminosäuren Tryptophan und Cystein nicht erfaßt, da beide durch die saure Hydrolyse zerstört werden. Die Auftrennung des Aminosäuregemisches und die quantitative Bestimmung der einzelnen Aminosäuren erfolgt in einem automatischen Aminosäureanalysator (Biotronik Serie 6000). Zur Auftrennung wird eine Ionenaustauschersäule (Durrum, DC 6 A, 0,6 cm Ø x 27 cm Harzhöhe) benutzt. Die Elution der Aminosäuren erfolgt mit Trilitiumcitrat- Puffern steigenden pH- Wertes

(s. u.) sowie durch schrittweise Erhöhung der Säulentemperatur von 37° C auf 65° C. Die quantitative Bestimmung erfolgt nach Zusatz von Ninhydrin- Reagenz im Durchflußphotometer bei 440 und 510 nm. Die Extinktion wird mit einem Schreiber registriert. Die Fläche des Extinktionssignales ist ein Maß für die Substanzmenge; sie wird durch automatische Integration ermittelt. Die Eichung erfolgt durch ein Gemisch von Standard- Aminosäurelösungen.
Folgende Puffer werden zur Durchführung der Analysen benötigt:

Puffer A: 60 mM Li- Citrat / 11 mM Phenol / 0,001 % Brij / 0,01 % n- Propanol, pH 2,80

Puffer B: 60 mM Li- Citrat / 50 mM LiCl / 11 mM Phenol / 0,001 % Brij / 0,01 % n- Propanol, pH 3,10

Puffer C: 60 mM Li- Citrat / 170 mM LiCl / 11 mM Phenol / 0,001 % Brij, pH 3,36

Puffer D: 60 mM Li- Citrat / 219 mM LiCl / 11 mM Phenol / 0,001 % Brij, pH 4,0

Puffer E: 60 mM Li- Citrat / 1,47 M LiCl / 11 mM Phenol / 0,001 % Brij, pH 3,3

Der Puffer A dient gleichzeitig als Probenauftragspuffer.

2.2.11. Quantitative Tryptophanbestimmung in Proteinen nach PENKE et al. (1974)

Abgesehen von der Hydrolyse ist diese Methode identisch mit der unter 2.2.10. beschriebenen.
Zu den gefriergetrockneten Proteinen (0,1- 0,2 mg) werden 0,2 ml 3 N Mercaptoäthansulfonsäure (Pierce, Sequanal Grade) gegeben und anschließend im Ölbad bei 110° C hydrolysiert (24, 48 und 96 Stunden). Nach dem Öffnen des Hydrolyserohres werden zu der Hydrolysatlösung 0,2 ml gesättigte LiOH und 0,6 ml Puffer A, pH 2,0 (siehe 2.2.10.) gegeben. Aliquote dieser Lösung werden auf den Aminosäureanalysator gegeben.

2.2.12. Quantitative Cysteinbestimmung in Proteinen nach ELLMAN (1958 und 1959)

Bei dieser Titration entsteht durch Reaktion freier -SH Gruppen mit dem Ellman- Reagenz (5,5'- Dithiobis- (2- Nitrobenzoesäure)) ein roter Farbkomplex, dessen Konzentration photometrisch bei 412 nm bestimmt werden kann.
Die zu untersuchende Lösung mit denaturierten Proteinen wird über Nacht bei Raumtemperatur gegen 100 mM Na_2HPO_4 / 0,1 mM EDTA / 1 % SDS, pH 7,9 dialysiert. Für jede Messung werden 0,1 ml Probenlösung zu 2,9 ml 10 mM DTNB / 100 mM Na_2HPO_4 /0,1 mM EDTA / 1 % SDS, pH 7,9 gegeben, 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen und anschließend im Photometer gemessen. Zur Standardisierung dieser Meßmethode wird eine Eichkurve mit einer Cysteinmaßlösung aufgenommen.

2.2.13. Bestimmung von Sedimentationskoeffizienten durch analytische Ultrazentrifugation (CHERVENKA, 1969)

Alle Messungen werden bei 20° C in einer Beckmann- Spinco-Ultrazentrifuge (Modell E mit Rotor An- H Ti und 12 mm- Doppel- Sektor- Zelle) durchgeführt. Die Konzentrationsverteilung über die Zellenlänge wird mit einem photoelektronischen Scanner bei einer Wellenlänge von 280 nm registriert. Aus der Auftragung des Logarithmus der Wanderungsstrecke $\bar{x}$ der Protein- Lösungsmittel- Grenzschicht gegen die Zeit oder über das Computerprogramm PROGRAMM I (siehe 2.3.1.) können die Sedimentationskoeffizienten nach folgender Gleichung berechnet werden:

$$s = \frac{2.303}{60 \cdot \omega^2} \cdot \frac{d \log \bar{x}}{d t}$$

Für Korrektur der erhaltenen Werte auf Standardbedingungen wird folgende Gleichung benutzt:

$$s \cdot \frac{\eta_{H_2O,\ 4^\circ C}}{\eta_{H_2O,\ 20^\circ C}} \cdot \frac{\eta_{Lösung}}{\eta_{H_2O}} \cdot \frac{1 - \bar{v} \cdot \rho_{H_2O,\ 20^\circ C}}{1 - \bar{v} \cdot \rho_{Lösung,\ 4^\circ C}} = s_{20,\ w}$$

Die Daten für die Dichten sowie die Viskositäten des Wassers werden einem Tabellenwerk (HANDBOOK of CHEMISTRY and PHYSICS, 1971- 1972) entnommen; für die Werte der Viskosität sowie der Dichte der Probenlösung werden diejenigen des Lösungsmittels verwendet. Die Viskosität des Lösungsmittels wird

in einem KPG- Ubbelohde- Viskosimeter, seine Dichte durch Wiegen eines genau bekannten Volumens bestimmt. Das partielle spezifische Volumen wird aus der Aminosäurezusammensetzung berechnet (COHN und EDSALL, 1943).

2.2.14. Immundoppeldiffusion nach OUCHTERLONY (1949) und HÖRL et al. (1978)

a) natives System:
Immunreaktionen der Antikörper mit nativer Holo- Phosphorylase Kinase und nativem sarcoplasmatischen Reticulum werden untersucht.
0,8 % Agarose wird in 50 mM GP, pH 7,0 gelöst, indem unter Rühren so lange erhitzt wird, bis die Lösung klar wird. Zur Vermeidung von Bakterienwachstum werden 0,05 % NaN_3 zugesetzt. 2,5 ml dieser heißen Agaroselösung wird auf einen Objektträger (76 x 26 mm) aufgetragen. Nach dem Erstarren des Gels werden Löcher mit 4 mm Durchmesser ausgestanzt: ein zentrales und 6 periphere Löcher im Abstand von 8 mm. In diese Löcher werden Antikörper und Antigen (ca. 20 µg Protein gelöst in 10- 20 µl Puffer) pipettiert, welche man 48 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer gegeneinander diffundieren läßt. In den Fällen, wo das Antigen wesentlich größer ist als der Antikörper (z.B. Phosphorylase Kinase), wird anfangs nur das Antigen einpipettiert und 1 Stunde vorlaufen gelassen. Anschließend erst wird der Antikörper in die entsprechenden Löcher gegeben. Nach der Inkubation werden die Gele 24 Stunden in 50 mM GP, pH 7,0, 1 Stunde in Wasser gewaschen und anschließend mit einem feuchten Filterpapierstreifen, den man blasenfrei auf das Gel legt, getrocknet. Die trockenen Gele werden in 5 % Amidoschwarz (gelöst in 90 % Methanol / 10 % Essigsäure) für 2 Minuten gefärbt. Darauf wird überschüssiger Farbstoff mit 90 % Methanol / 10 % Essigsäure herausgewaschen.

b) denaturiertes System:
Immunreaktionen der Antikörper mit den isolierten, dena-

turierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase und des sarcoplasmatischen Reticulum werden untersucht.
0,8 % Agarose wird in 0,1 M Glycin / 38 mM Tris / 1 % Triton- X 100 / 0,05 % NaN_3 gelöst. Die Gele werden wie unter a) beschrieben gegossen und gestanzt. Vor dem Einpipettieren der Antigene und Antikörper werden diese gegen den oben genannten Puffer dialysiert. Da das Triton- X 100 nicht durch die Dialysemembran hindurchgeht , werden in der Probe vor der Dialyse 1 % Triton- X 100 eingestellt.
Nach der Diffusion (48 Stunden) wird für 5- 6 Stunden im beschriebenen Puffer, anschließend für 10 Stunden in 0,1 M NaCl und endlich für 1 Stunde in Wasser gewaschen. Das Trocknen und Anfärben der Ouchterlonygele erfolgt wie unter a) beschrieben.

2.2.15. Bestimmung des Substitutionsgrades in aminsubstituierter Sepharose nach JENNISSEN und HEILMEYER (1975)

Etwa 1 ml substituierte Sepharose wird in eine graduierte 5 ml Säule gefüllt. Nach dem Trockenlaufen der Säule wird das genaue Gelvolumen bestimmt und anschließend quantitativ in ein Reagenzglas überführt. Dort wird das Gel mit 1 ml 32 % HCl für 45 Minuten bei 50° C hydrolysiert. Das Hydrolysat wird mit 0,1 ml 20 N NaOH und 18 ml Toluol- Triton- Szintillationslösung versetzt und anschließend im Szintillationszähler gemessen.
Die Menge des an die Sepharose gebundenen Amins wird als µMol Alkylamin pro ml gepackte Sepharose angegeben.

2.3. Berechnungen

Alle Berechnungen mit den unten aufgeführten Fortran- Programmen wurden am Großrechner des Rechenzentrums der Ruhr-Universität Bochum durchgeführt, zum Teil unter Benutzung von Unterprogrammen aus der Programmbibliothek des Rechenzentrums. Die Texte sämtlicher benutzter Programme sind im Anhang wiedergegeben.

2.3.1. PROGRAMM I (JAHNKE, 1981)

Mit Hilfe dieses Programmes können die Sedimentationskoeffizienten von Substanzen nach analytischer Ultrazentrifugation ermittelt werden. Es basiert auf folgender Gleichung:

$$S = 1/\omega^2 \ (d\ln\bar{x}/dt)$$

wobei $\bar{x}$ die Position der Grenzschicht zwischen Lösungsmittel und Probe ist. Da sich $\bar{x}$ unter anderem durch Diffusion verbreitet, wurde entweder die Stelle genommen, an der dc/dx ein Maximum annimmt, oder die Halbstufe des Konzentrationsprofiles.
Das Programm berechnet die einzelnen Werte für S zwischen je zwei Zeitintervallen, um systematische Fehler aufzuzeigen. Aus der Regressionsgeraden $\ln \bar{x}/t$ wird ein Gesamtwert für S errechnet.

2.3.2. PROGRAMM II

Die experimentell ermittelten Werte für die spezifischen Radioaktivitäten des Leucins im Präcursorpool in Abhängigkeit von der Zeit zeigen einen exponentiellen Abfall im gesamten untersuchten Zeitraum (0,5- 15 Tage nach Pulsmarkierung).
Das PROGRAMM II paßt die experimentell ermittelten Werte durch folgende Funktion an:

$$F^* = b \cdot e^{mx}$$

Hierbei ist F^* die spezifische Radioaktivität des Leucins

im Präcursorpool und x die Anzahl der Tage nach Pulsmarkierung. Durch das Programm werden die beiden Größen m (charakterisiert die Steigung der Exponentialfunktion) und b (extrapolierter Wert für die spezifische Radioaktivität des Leucins im Präcursorpool zum Zeitpunkt 0) ermittelt, die für die Berechnung des k_p- Wertes mit dem PROGRAMM III gebraucht werden.

2.3.3. PROGRAMM III

Durch dieses Programm werden die ermittelten experimentellen Werte für die spezifische Radioaktivität des Leucins in den einzelnen Polypeptiden zu verschiedenen Zeitpunkten nach Pulsmarkierung durch folgende Funktion angepaßt:

$$P^*(t) = k_p \cdot e^{-k_p \cdot t} \int_0^t e^{k_p \cdot u} \cdot F^*(u)\,du$$

Hierbei ist P^* die spezifische Radioaktivität des Leucins im Protein, k_p die gesuchte Degradationskonstante und $F^*(u)du$ die spezifische Radioaktivität des Leucins im Precursorpool in Abhängigkeit von der Zeit nach Pulsmarkierung (siehe 2.3.2.) (ZAK et al., 1979).
Der Computer berechnet nach einem "Simplex- Verfahren" die verschiedenen k_p- Werte bis die Standardabweichung (experimentelle Punkte- errechnete Punkte) ein Minimum erreicht hat. (Das "Simplex- Verfahren" sucht in einem Teilintervall für die zu optimierenden Größen nach einem lokalen Minimum.)

PROGRAMM II und PROGRAMM III enthalten folgende Unterprogramme:

MINNB2: Berechnung eines relativen Minimums einer Funktion von n Variablen ohne Verwendung von Ableitungen der gegebenen Funktion.

SQUFIT: Programm zur nicht linearen Anpassung von Meßdaten nach der Methode der kleinsten Quadrate.

AINTEG: Berechnung des bestimmten Integrals einer reellen Funktion über einem Intervall (numerische Integration).

3. Theoretische Grundlagen der benutzten Methoden zur Messung des Turnovers von Proteinen

In vielen Arbeiten über den intrazellulären Turnover wurden die Halbwertszeiten von Proteinen aus der Abnahme der spezifischen Radioaktivität der Polypeptide nach Pulsmarkierung mit radioaktiv markierten Aminosäuren bestimmt. Diese Experimente beweisen eindeutig, daß es einen Proteinturnover gibt, doch die so ermittelten Halbwertszeiten der Proteine sind zu lang. Die markierten Aminosäuren werden nicht so schnell wie angenommen aus dem Aminosäurepool des Körpers ausgeschieden. Dadurch kommt es zu einem Wiedereinbau der Aminosäuren ("Recycling"), wodurch das zu langsame Abfallen der spezifischen Radioaktivität in den Proteinen erklärt werden kann.
Um wirkliche Halbwertszeiten zu bestimmen, muß die spezifische Radioaktivität der verabreichten Aminosäure nicht nur im Protein, sondern auch in dem Aminosäurepool bestimmt werden, aus welchem das untersuchte Protein synthetisiert wird (Präcursorpool). Näherungsweise kann das intra- oder das extrazelluläre Aminosäurepool als Precursorpool betrachtet werden. Besser wäre es jedoch, die spezifische Radioaktivität in der als Aminoacyl- tRNA gebundenen Aminosäure zu messen, da dies die direkte Vorstufe vor Einbau der Aminosäure in die wachsende Polypeptidkette am Ribosom ist.
Die Anwendbarkeit der Pulsmarkierungsmethode und der Doppelmarkierungsmethode, die eine besondere Form der Pulsmarkierungsmethode ist, setzt die Erfüllung folgender Bedingungen voraus (ARIAS et al., 1969).
1. Während der Versuchsdauer darf sich das Körpergewicht des Versuchstieres nicht ändern. Die Menge des untersuchten Proteins muß konstant bleiben ("Steady state").
2. Die markierten Proteine werden genau wie die nicht markierten Proteine synthetisiert und degradiert.
3. Durch das Verabreichen der markierten Aminosäure dürfen die Konzentrationsverhältnisse der Aminosäuren im Pool nicht verändert werden.

4. Radioaktive Metabolite der markierten Aminosäure dürfen nicht in andere Aminosäuren eingebaut werden.
5. Alle Proteine werden aus einem Aminosäurepool synthetisiert.

Bei der Durchführung von Pulsmarkierungsexperimenten wird nach Gabe des Pulses die spezifische Radioaktivität der benutzten Aminosäure über eine bestimmte Zeit in Intervallen sowohl im Protein als auch im Precursorpool bestimmt. Typische Verlaufskurven dieser Art werden in der Abbildung 2 dargestellt (ZAK et al., 1979).

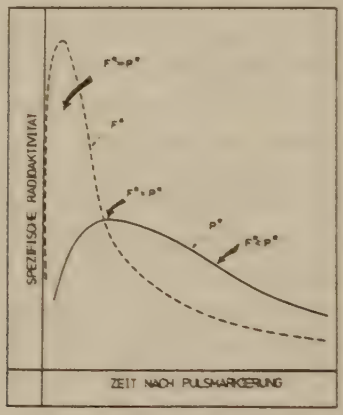


Abb. 2: Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität einer Aminosäure im Protein und Präcursorpool nach Pulsmarkierung.
P* : spezifische Radioaktivität der Aminosäure im Protein
F* : spezifische Radioaktivität der Aminosäure im Präcursorpool

Die markierte Aminosäure vermischt sich innerhalb weniger Sekunden nach Injektion mit dem zirkulierenden Blut und erreicht ihre höchste spezifische Radioaktivität im Präcursorpool als Aminoacyl- tRNA nach 2- 4 Minuten. Dem steilen Anstieg der spezifischen Radioaktivität folgt ein rascher Abfall, hervorgerufen durch das Vermischen der Aminosäuren des Blutes mit diesen der intra- und extra-

zellulären Kompartimente (ZAK et al., 1979).
Die spezifische Radioaktivität im Protein steigt anfangs am stärksten an, um dann langsamer werdend die Höhe der spezifischen Radioaktivität im Präcursorpool zu erreichen ("Cross- over point"). An diesem Punkt ist die maximale spezifische Radioaktivität im Protein erreicht. Danach fällt diese wieder ab, ist aber immer höher als die spezifische Radioaktivität im Präcursorpool.
Diese beschriebenen Kurven können aber auch mathematisch formuliert werden. Für ein Protein, dessen Konzentration über einen längeren Zeitraum konstant bleibt, kann die Änderung der spezifischen Radioaktivität zu jeder Zeit nach Gabe des Pulses durch folgende Differentialgleichung berechnet werden (JOHNSON und VELICK, 1972):

$$C \cdot \frac{dS}{dt} = k_s \cdot P_t - k_d \cdot C \cdot S_t \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

Die benutzten Symbole haben folgende Bedeutung:
P_t : spezifische Radioaktivität des Präcursorpools zu Zeit t
S_t : spezifische Radioaktivität des Proteins zur Zeit t
k_s : Reaktionskonstante O. Ordnung für die Synthese
k_d : Reaktionskonstante 1. Ordnung für die Degradation
C : Proteinkonzentration

Da im "Steady state" gleiche Mengen eines Proteins synthetisiert und degradiert werden, gilt auch folgende Beziehung:

$$k_s = k_d \cdot C \qquad \text{(Gleichung 2)}$$

3.1. Einfachmarkierungsexperimente

Die Ermittlung der relativen Turnoverraten der Proteine kann aus drei verschiedenen Bereichen der Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität der verwendeten Aminosäure im Protein nach Pulsmarkierung vorgenommen werden.
a) Bestimmung relativer Turnoverraten aus dem initialen Einbau:
Zu frühen Zeitpunkten nach Gabe des Pulses ist der negative Teil der Differentialgleichung (Gleichung 1) noch sehr klein und kann deshalb vernachlässigt werden. Aus diesem

Grund läßt sich die Veränderung der spezifischen Radioaktivität kurz nach Gabe des Pulses mit Gleichung 3 beschreiben (JOHNSON und VELICK, 1972):

$$C \cdot \frac{dS}{dt} = k_s \cdot P_t \qquad \text{(Gleichung 3)}$$

Das Integral der Gleichung 3 gibt die Höhe der spezifischen Radioaktivität zu frühen Zeitpunkten nach Gabe des Pulses an (Gleichung 4); dabei ist P(t) die Zeitfunktion der spezifischen Radioaktivität im Präcursorpool:

$$C \cdot S_t = k_s \cdot \int_0^t P(t) \cdot dt \qquad \text{(Gleichung 4)}$$

Die Beziehung der spezifischen Radioaktivität zweier Proteine a und b, die vom gleichen Präcursorpool synthetisiert worden sind, wird durch folgendes Verhältnis beschrieben:

$$\frac{C_a \cdot (S_t)_a}{C_b \cdot (S_t)_b} = \frac{(k_s)_a \cdot \int_0^t P(t) \cdot dt}{(k_s)_b \cdot \int_0^t P(t) \cdot dt} \qquad \text{(Gleichung 5)}$$

Da für den "Steady state" die Gleichung 2 gilt, ergibt sich durch Einsetzen in Gleichung 5 folgende Beziehung:

$$\frac{(S_t)_a}{(S_t)_b} = \frac{(k_d)_a}{(k_d)_b}$$

Weil die Reaktionskonstanten der Degradation (Turnoverkonstanten) und damit auch die Halbwertszeiten der Proteine ($t_{1/2} = \ln 2/k_d$) zu frühen Zeiten nach Pulsmarkierung proportional den spezifischen Radioaktivitäten in den Proteinen sind, lassen sich aus den initialen Einbauraten die relativen Turnoverraten berechnen.

b) Bestimmung relativer Turnoverraten aus der maximalen spezifischen Radioaktivität:

Im Maximum verändert sich die spezifische Radioaktivität im Protein nicht (dS/dt = 0). Für diesen speziellen Fall kann Gleichung 1 folgendermaßen formuliert werden (JOHNSON und VELICK, 1972):

$$k_s \cdot P_t = k_d \cdot C \cdot (S_t)_{max}$$

Durch das Einbeziehen der Gleichung 2 gilt:

$$k_s \cdot P_t = k_s \cdot (S_t)_{max}$$

$$P_t = (S_t)_{max}$$

Aus dieser letzten Beziehung geht zwingend hervor, daß die Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität im Protein nach Pulsmarkierung im Maximum von der Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität im Präcursorpool geschnitten werden muß. Eine Auftragung mehrerer Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität im Protein, wie sie nach Vorgabe verschiedener k_p- Werte und eines Präcursorpools vom Computer errechnet worden sind (Abb.3), zeigt, daß die maximale spezifische Radioaktivität um so höher ist und dieses Maximum zeitlich um so früher erreicht wird, je höher der relative Turnover des betrachteten Proteins ist. Aus diesem Grunde lassen sich relative Turnoverraten aus der absoluten Größe der maximalen spezifischen Radioaktivität berechnen.

c) Bestimmung relativer Turnoverraten aus dem Abfall der Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität im Protein:

Durch das Einbeziehen der Gleichung 2 in die Gleichung 1 ergibt sich folgende Beziehung (JOHNSON und VELICK, 1972):

$$\frac{dS}{dt} = k_d \cdot P_t - k_d \cdot S_t$$

Durch Umformung ergibt sich Gleichung 6:

$$k_d = \frac{dS}{dt} \cdot \frac{1}{P_t - S_t} \qquad \text{(Gleichung 6)}$$

Da k_d proportional dem Abfall der Einbaukurve ist, lassen sich aus diesem die relativen Turnoverraten berechnen.

Die drei beschriebenen Wege zeigen Möglichkeiten zur Berechnung von relativen Turnoverraten und Halbwertszeiten, die aber aus geschilderten Gründen zu lang sind.
Um wirkliche Halbwertszeiten berechnen zu können, muß das

"Recycling" der markierten Aminosäure berücksichtigt werden. Nach Umformung der Gleichung 6 ergibt sich die Gleichung 7 (ZAK et al., 1979):

$$\frac{dS}{dt} = k_d \cdot (P_t - S_t) \qquad \text{(Gleichung 7)}$$

Diese Beziehung beschreibt die Veränderung der spezifischen Radioaktivität im "Steady state" zu jeder Zeit nach Pulsmarkierung. Nach dem Auflösen dieser Gleichung nach S_t als Funktion von P_t ergibt sich Gleichung 8:

$$S_t = k_p \cdot e^{-k_p \cdot t} \cdot \int_0^t e^{k_p \cdot u} \cdot P(u) \cdot du \qquad \text{(Gleichung 8)}$$

Die Berechnung der Turnoverkonstanten (k_p) nach dieser Gleichung erfolgt über das Computerprogramm PROGRAMM III (siehe 2.3.3.), nachdem die Zeitfunktion für das Präcursorpool mit Hilfe des Computerprogramms PROGRAMM II ermittelt worden ist.

3.2. Doppelmarkierungsexperiment

Eine besondere Art der Pulsmarkierung ist die Doppelisotopenmarkierung. Mit ihr können die ermittelten Turnoverraten der Pulsmarkierungsexperimente überprüft werden. Diese Methode ist unabhängig von den möglichen Fehlerquellen Aminosäureanalyse, Proteinbestimmung sowie Messung und Wahl des Präcursorpools bei der einfachen Pulsmarkierung.
Bei der Doppelisotopenmarkierung werden in einem Experiment zwei Punkte der Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität im Protein erhalten. Die Tiere werden mit einer radioaktiv markierten Aminosäure (z.B. ^{3}H- Leucin) einer ersten Pulsmarkierung unterzogen. Nach einer Inkorporationsdauer von ca. 2- 3 Halbwertszeiten der untersuchten Proteine folgt eine zweite Pulsmarkierung. Es wird wieder die gleiche Aminosäure injiziert, die aber mit einem anderen Isotop markiert ist (z.B. ^{14}C- Leucin). Wenige Stunden nach dieser zweiten Pulsmarkierung wird das Tier geschlachtet.

Während die Einbaurate der zuerst verabreichten Aminosäure ein Maß für die Degradationsgeschwindigkeit des Proteins ist, beschreibt der radioaktive Einbau der zweiten Aminosäure die Geschwindigkeit des initialen Einbaus.

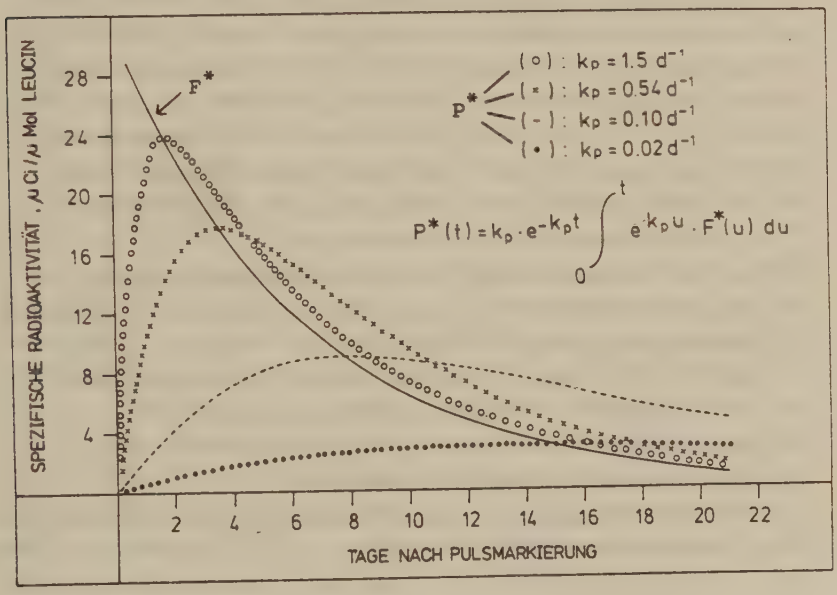


Abb. 3: Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität im Protein nach Pulsmarkierung als Funktion von k_p.
Diese Kurven wurden von einem Computer nach dem Programm III (siehe 2.3.3.) berechnet. Vorgegeben wurde ein Präcursorpool und verschiedene k_p- Werte.

Wie die Abbildung 3 veranschaulicht, ist nach 21 Tagen Inkorporation der ersten markierten Aminosäure die spezifische Radioaktivität dieser bereits wieder stark abgefallen, und zwar um so mehr, je höher der k_p- Wert ist. Dagegen ist 1 Tag nach Injektion der zweiten markierten Aminosäure die spezifische Radioaktivität dieser im Protein um so größer, je höher der k_p- Wert ist. Durch diese Umkehr in der Höhe der spezifischen Radioaktivität der

Aminosäuren im Protein (Verstärkungsfaktor) und bei richtiger Wahl des Injektionszeitplanes ist es mit dieser Methode möglich, auch kleine Unterschiede in den relativen Turnoverraten bei Proteinen zu bestimmen.
Unabhängig von der absoluten Größe der spezifischen Radioaktivitäten für die beiden Isotope im Protein haben Polypeptide mit einem hohen Turnover einen großen $^{14}C/^{3}H$-Quotienten, wogegen Proteine mit einem niedrigen Turnover einen kleinen Quotienten besitzen. Das Verhältnis der einzelnen $^{14}C/^{3}H$- Quotienten zueinander ist ein Maß für die relativen Turnoverraten, wenn auch keine direkte Linearität zwischen der Höhe des Turnovers und dem Verhältnis der $^{14}C/^{3}H$- Quotienten zueinander besteht.
Neben den Bedingungen für die Pulsmarkierungsmethode ist bei der Doppelmarkierung von folgenden weiteren Voraussetzungen ausgegangen worden (ARIAS et al., 1969):
1. Die Synthese- und Degradationsrate der Proteine ist für die beiden verabreichten Aminosäuren gleich.
2. Die Proteine werden nach einer Reaktion 1. Ordnung degradiert (exponentieller Zerfall).
3. Bei Schlachtung der Tiere werden die zweifach markierten Proteine bereits wieder abgebaut.

4. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit werden Turnoverexperimente an Muskelenzymen von Kaninchen durchgeführt. Es werden gerade diese Enzyme gewählt, da viele von ihnen in der Literatur bereits gut beschrieben sind und einige unter ihnen biologisch und strukturell sehr interessant sind (siehe Einleitung). Der Turnover dieser Enzyme soll über einen Zeitraum von 21 Tagen mit Hilfe der Pulsmarkierungsmethode untersucht werden.
Für jedes Turnoverexperiment werden 8- 10 Kaninchen benötigt. Ihnen wird pro 1 kg Körpergewicht 180 µCi/kg ^{3}H- Leucin in die Ohrvene verabreicht (siehe 2.1.2.a). Die einzelnen Turnoverexperimente unterscheiden sich nur in der unterschiedlichen Länge der ^{3}H- Leucin Inkorporationsdauer. Es werden insgesamt 12 Pulsmarkierungsexperimente mit Inkorporationszeiten zwischen 0,5 und 21 Tagen durchgeführt, wobei es sich bei dem 21 Tage Experiment um ein Doppelmarkierungsexperiment handelt (siehe 2.1.2.b). Anschließend werden die Tiere geschlachtet (siehe 2.1.1.) und neben der Skelettmuskulatur auch noch andere Gewebe wie Herz, Zwerchfell, Niere, Leber und Gehirn entnommen.
4 kg der Skelettmuskulatur werden sofort für eine Präparation der Phosphorylase Kinase (siehe 2.1.3.) eingesetzt (Ausbeute: 40- 120 mg Enzym), während die restliche Skelettmuskulatur und die übrigen genannten Gewebe in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, lyophilisiert und bei -20° C zur späteren Auswertung gelagert.

4.1. Isolierung von Polypeptiden und Aminosäuren für die Turnoveruntersuchungen

4.1.1. Präparation der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase

Untersuchungen über den Turnover des Holoenzyms Phosphorylase Kinase wurden bereits beschrieben (JENNISSEN et al., 1975). In dieser Arbeit sollen Turnoverstudien an den

isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase durchgeführt werden. Aus diesem Grund werden die heterologen Untereinheiten aus dem Holoenzym, welches aus der Skelettmuskulatur der Kaninchen nach Pulsmarkierung gewonnen wurde, isoliert. In diesen Untereinheiten wird anschließend die spezifische Radioaktivität des Leucins bestimmt.
Die Phosphorylase Kinase wurde direkt nach der Präparation lyophilisiert und bis zur weiteren Aufarbeitung in dieser Form bei -20° C gelagert.
Bis auf die Gelfiltration bei der Reinigung der δ - Untereinheit werden sämtliche Präparationsschritte bei Raumtemperatur durchgeführt, da die Aufarbeitung in Gegenwart von SDS erfolgt, welches bei 4° C im Kühlraum auskristallisieren würde.

a) Präparation der δ - Untereinheit:
Durch Hitzedenaturierung wird zuerst die δ - Untereinheit aus dem Holoenzym gewonnen. Dazu wird das lyophilisierte Enzym in Wasser aufgenommen (10- 20 mg Protein/ml) und nach vollständiger Lösung des Lyophilisates für 4 Minuten auf dem siedenden Wasserbad erwärmt. Während sich in der Enzymlösung eine Temperatur von ca. 90° C einstellt, präzipitieren die drei Untereinheiten α, β und γ nahezu vollständig, während die δ - Untereinheit im Überstand verbleibt, welcher anschließend durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 15000 x g vom Sediment getrennt wird.
Zur endgültigen Reinigung der δ - Untereinheit wird der Überstand über ein Amicon PM 10 Filter auf ca. 1 ml ankonzentriert und anschließend über eine Sephadex G 75-Säule (1,5 cm Ø x 94 cm Gelhöhe) gelfiltriert. Diese Säule ist äquilibriert und wird eluiert mit 50 mM GP / 200 mM NH_4Cl / 1 mM EGTA, pH 7,0.
Wie aus der Reinigungstabelle (Tabelle 1) zu ersehen ist, beträgt die Proteinausbeute nach dieser Präparationsmethode ca. 85 %. Aus diesem Grund wird diese Methode der von COHEN et al. (1978) beschriebenen (siehe 2.1.9.) vorgezogen, bei der nur eine Proteinausbeute von ca. 38 % erreicht wird.

Die zur Kontrolle nach beiden Methoden durchgeführte Präparation der δ- Untereinheit des Tages 15 zeigte bei einer Divergenz der gemessenen spezifischen Radioaktivität des Leucins in diesen beiden Proben von 6 %, daß beide Präparationsmethoden für unsere Messungen identische δ- Untereinheiten ergeben.

b) Präparation der γ- Untereinheit:
Die Assoziationskonstanten der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase zueinander sind so hoch, daß es bisher nur möglich war, sie durch Kochen in ME / SDS zu dissoziieren. Deshalb wird zur Isolierung der übrigen Untereinheiten das Sediment, welches bei der Präparation der δ- Untereinheit nach der Hitzedenaturierung ausgefallen ist, in 1 % SDS / 1 % ME aufgelöst und für 5 Minuten auf 100° C erwärmt. Durch Gelfiltration über Sephadex G 200 wird die γ- Untereinheit wie unter 2.1.10. beschrieben von den Untereinheiten α und β abgetrennt (siehe Abbildung 4 und 5).

c) Präparation der Untereinheiten α und β:
Eine Trennung der verbleibenden Untereinheiten α und β war bisher nicht möglich. Die Isolierung ist so schwierig, da sie aus beschriebenen Gründen in SDS erfolgen muß, und damit praktisch nur eine Trennung nach Molekulargewicht möglich ist. Erschwerend ist die Tatsache, daß die Molekulargewichte dieser Untereinheiten (135000 und 120000) sehr groß und einander sehr ähnlich sind. In dieser Arbeit wurde eine neue Methode für dieses Trennungsproblem entwickelt.
Die Fraktionen des ersten Proteingipfels von der Gelfiltration über Sephadex G 200 zur Isolierung der γ- Untereinheit (siehe Abbildung 4) enthalten die beiden Untereinheiten α und β. Diese Fraktionen werden vereinigt und auf eine Hydroxylapatit- Säule (5 cm Ø x 2,2 cm Gelhöhe) aufgepumpt, die mit 10 mM NaH_2PO_4 / 1 mM DTE / 0,05 % NaN_3 / 0,1 % SDS / 1 mM EGTA / 10^{-4} M PMSF, pH 6,4 (= Puffer B) äquilibriert ist. Die Menge des Hydroxylapatits ist so bemessen, daß pro 1 mg für die gesamte Untereinheitenprä-

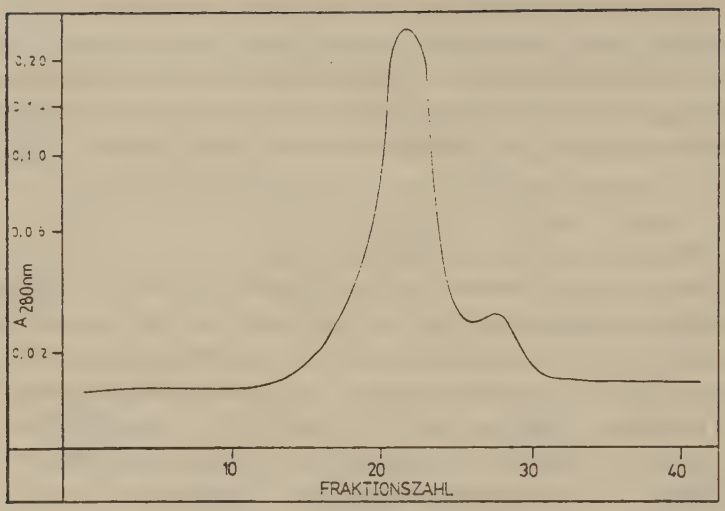


Abb. 4: Trennung der γ- Untereinheit von den Untereinheiten α und β der denaturierten Phosphorylase Kinase in Gegenwart von SDS auf Sephadex G 200.

21 mg denaturierte Phosphorylase Kinase (2 ml) werden mit einer Pumpgeschwindigkeit von 11 ml/h über eine Sephadex G 200- Säule (2 cm Ø x 98 cm Gelhöhe), äquilibriert mit Puffer B, gelfiltriert.

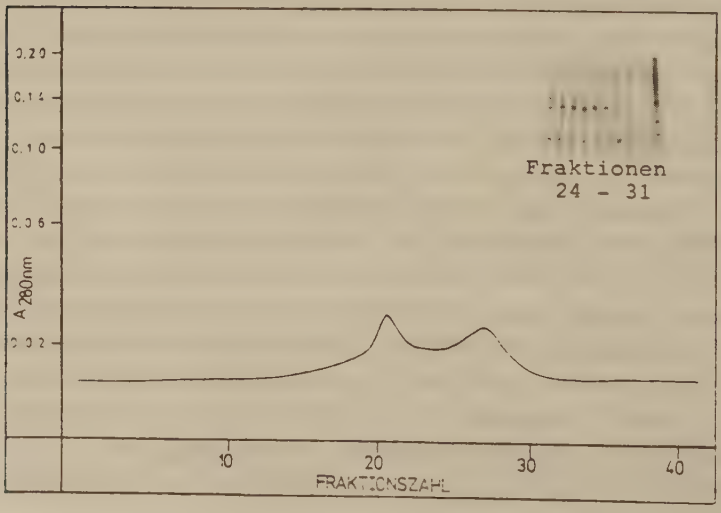


Abb. 5: Endreinigung der γ- Untereinheit der Phosphorylase-Kinase auf Sephadex G 200 in Gegenwart von SDS.

4,3 mg γ- Untereinheit (kontaminiert mit Spuren der Untereinheiten α und β) gelöst in 2 ml Puffer B werden chromatographiert. Die genauen Trennbedingungen werden in der Legende der Abbildung 4 beschrieben. Jeweils 30 µl aus den Fraktionen wurden SDS- gelelektrophoretisch nach 2.2.7.c (5 % Polyacrylamid) untersucht. Als Referenzprotein diente Phosphorylase Kinase (Einschub).

paration eingesetzte Phosphorylase Kinase 1 ml gepacktes Hydroxylapatit vorgelegt wird. Unter den beschriebenen Bedingungen werden die beiden Proteine fest an das Hydroxylapatit adsorbiert. Nach dem Auftrag wird mit 100 ml Puffer B und anschließend mit weiteren 100 ml Puffer B, in welchem aber eine Phosphatkonzentration von 100 mM eingestellt ist, gewaschen. Schließlich werden die Polypeptide durch Anlegen eines Phosphatgradienten von 100 mM- 600 mM PO_4^{3-} nacheinander eluiert. Im Konzentrationsbereich von 430 mM- 450 mM PO_4^{3-} wird die α- Untereinheit (siehe Abbildung 6), die noch bis zu 10 % mit α' und bis zu 22 % mit der β- Untereinheit kontaminiert sein kann, eluiert. Die β- Untereinheit wird von 450 mM bis 520 mM PO_4^{3-} eluiert (siehe Abbildung 6) und ist ebenfalls noch mit ca. 20 % der Untereinheiten α und α' verunreinigt. Das Elutionsbild und die Angaben über die Phosphatkonzentrationen beziehen sich auf das Hydroxylapatit der Chargen Nr. 19498 von der Firma BioRad. Für ein anderes Hydroxylapatit muß dieser Reinigungsschritt neu optimiert werden.

Die Endreinigung dieser Polypeptide wird über eine präparative Gelelektrophorese erreicht (siehe 2.1.12.). Nach dem Zusammengeben einerseits der Fraktionen mit der α- Untereinheit und andererseits der Fraktionen mit der β- Untereinheit werden diese beiden Proben über Nacht gegen 3 l Puffer B im Kühlraum dialysiert und anschließend über ein Amicon PM 10 Filter auf jeweils ca. 2 ml ankonzentriert. Die Dialyse muß durchgeführt werden, da das Amicon Filter bei höheren Phosphatkonzentrationen, in denen die Untereinheiten nach dem Hydroxylapatitschritt vorliegen, nicht durchlässig ist. Durch Gelfiltration über Sephadex

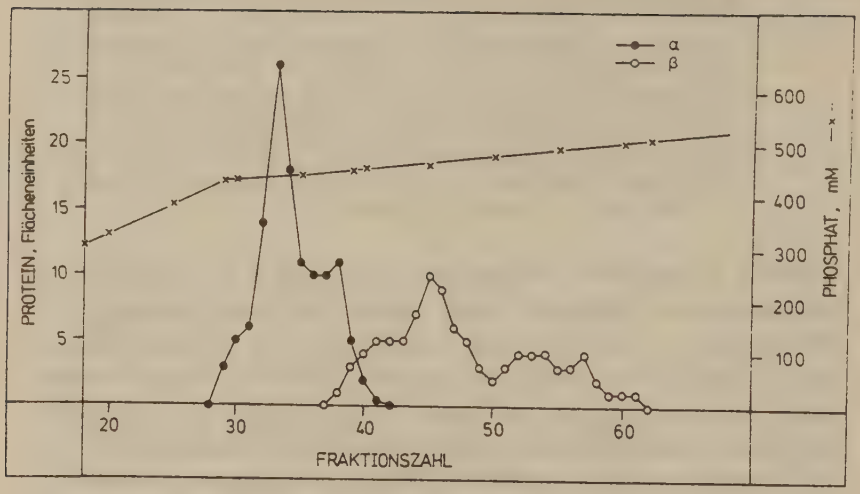


Abb. 6: Trennung der Untereinheiten α und β auf Hydroxylapatit in Gegenwart von SDS.

24,7 mg der Untereinheiten α und β , die in 52 ml Puffer B gelöst sind, werden mit einer Pumpgeschwindigkeit von 70 ml/h auf eine Hydroxylapatit- Säule (5 cm Ø x 2,2 cm Gelhöhe) aufgetragen. Nach dem Waschen mit 100 mM Phosphat in Puffer B werden die Untereinheiten nacheinander mit einem linearen Phosphatgradienten, der eine Stufe bei 440 mM Phosphat hat, eluiert. Das Fraktionsvolumen betrug 8,2 ml. Jeweils 30 µl aus den Fraktionen wurden SDS-gelelektrophoretisch nach 2.2.7.a untersucht und die Intensität der einzelnen Banden nach 2.2.8. bestimmt.

G 25 (Säule: 1,5 cm Ø x 40 cm Gelhöhe) werden diese Proben anschließend in den Probenpuffer für die präparative Elektrophorese überführt (siehe 2.1.12.). Zur Endreinigung wird ein Trenngel mit einer Polyacrylamidkonzentration von 7 % verwendet. Die Chromatogramme der beiden Läufe über die präparative Elektrophorese zur Endreinigung der Untereinheiten sind in den Abbildungen 7 und 8 dargestellt. Jedes Chromatogramm enthält als Einschub die SDS- gelelektrophoretische Untersuchung der Fraktionen.
Die Reinigungsgänge für die Isolierung der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase sind in der Reinigungstabelle

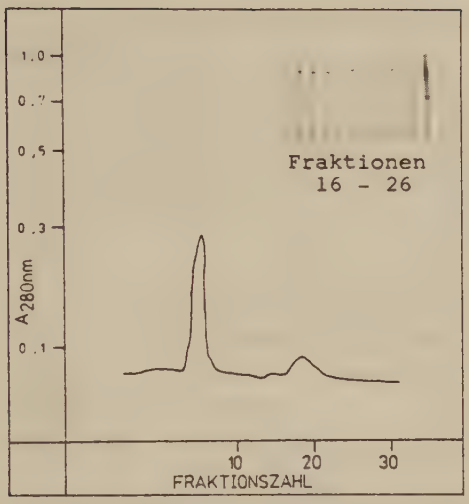


Abb. 7: Endreinigung der α- Untereinheit durch präparative Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von SDS.

2,6 mg Protein (α- Untereinheit kontaminiert mit Spuren der β- Untereinheit) werden aufgetragen. Das Sammelgel (10 ml) enthält 3 % Polyacrylamid, das Trenngel (40 ml) 7 % Polyacrylamid. Für das weitere Vorgehen siehe 2.1.12. Jeweils 30 µl aus den Fraktionen wurden SDS- gelelektrophoretisch nach 2.2.7.c (8 % Polyacrylamid) untersucht; als Referenzprotein diente Phosphorylase Kinase (Einschub).

(Tabelle 1) dargestellt. Die "Reinheit" der Untereinheiten wurde nach jedem Präparationsschritt nach densitometrischer Auswertung (siehe 2.2.8.) von SDS- Polyacrylamidgelen berechnet. Sie stellt den Quotienten aus der Menge der jeweils betrachteten Untereinheit (Fläche im Densitogramm) zur Gesamtmenge an Protein auf dem Gel x 100 % dar. Deshalb wird der Faktor bei vollständiger Reinheit der Untereinheiten gleich 100 %. Aus der Reinigungstabelle ist zu ersehen, daß die α- Untereinheit mit einer Gesamtausbeute von 36 %, die β- Untereinheit mit 43 %, die γ- Untereinheit mit 83 % und die δ - Untereinheit mit einer Ausbeute von 85 % isoliert werden können. Diese Berechnungen gehen

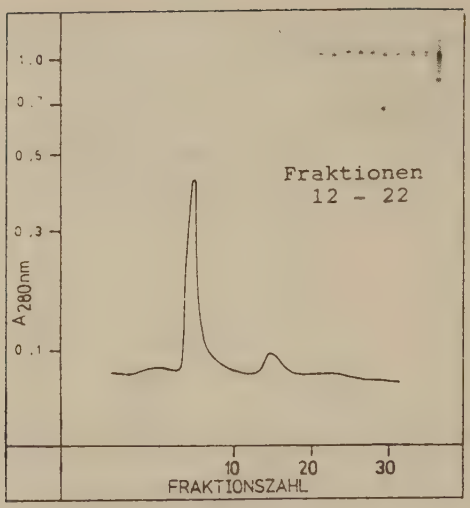


Abb. 8: Endreinigung der β- Untereinheit durch präparative Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von SDS.

2,3 mg Protein (β- Untereinheit kontaminiert mit Spuren der α- Untereinheit) werden aufgetragen. Weitere Bedingungen werden in der Legende zu der Abbildung 7 beschrieben.

UNTEREINHEIT	SCHRITT	REINHEIT, %	ANREICHERUNG	AUSBEUTE, %	PROTEIN (gesamt), mg
α	(Holoenzym)	40	1	100	12,7
	Sephadex G 200	43	1,1	88	9,6
	Hydroxylapatit	78	2,0	59	3,4
	präp. Elektrophorese	100	2,5	36	2,1
β	(Holoenzym)	36	1	100	12,7
	Sephadex G 200	41	1,1	88	9,6
	Hydroxylapatit	84	2,3	76	3,3
	präp. Elektrophorese	100	2,8	43	2,2
γ	(Holoenzym)	13	1	100	12,7
	Sephadex G 200 I	94	7,2	93	1,8
	Sephadex G 200 II	100	7,7	83	1,6
δ	(Holoenzym)	5	1	100	15,2
	Hitzeschritt	96	19,2	108	0,7
	Sephadex G 75	100	20	85	0,8

Tab. 1: Reinigung der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase.

Unter "Holoenzym" ist das Ausgangsmaterial an reiner Phosphorylase Kinase (= 100 %) angegeben. Die "Reinheit" stellt den Quotienten dar, von der Menge an Untereinheit zur Menge an Gesamtprotein (densitometrisch nach SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese gemessen).

von einer Stöchiometrie der Untereinheiten in der Phosphorylase Kinase von 1:1:1:1 aus (COHEN et al., 1978). Die α- Untereinheit einiger Präparationen ist noch mit maximal 6 % α', der größten Untereinheit des Isoenzyms aus der roten Muskulatur, verunreinigt.

4.1.1.1. Reinheitskriterien für die isolierten Untereinheiten

Bevor die spezifische Radioaktivität des Leucins in den einzelnen Untereinheiten gemessen wird, müssen die Untereinheiten folgenden Reinheitskriterien genügen:

a) Polyacrylamidgele in Gegenwart von SDS (Reinheitskriterium für die Untereinheiten α, β, γ, und δ):
Die Abbildung 9 zeigt Polyacrylamidgele in Gegenwart von SDS mit einer Polyacrylamidkonzentration von 8 % (siehe 2.2.7.c). Jede Untereinheit erscheint als eine homogene Bande, so daß der Reinheitsfaktor 100 % beträgt.

b) Immundoppeldiffusion nach Ouchterlony (Reinheitskriterium für die Untereinheiten α, β und γ):
Wie die Abbildung 10 zeigt, bilden die Antikörper Anti α, Anti β und Anti γ bei Immundoppeldiffusion (siehe 2.2.14.b) gegen die isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase jeweils nur mit der Untereinheit eine Präzipitationslinie, die als Immunogen verwendet wurde (siehe 2.1.15.). Eine Kreuzreaktion eines Antikörpers mit den übrigen Untereinheiten ist nicht nachweisbar. Bei Anti δ kann in keinem Fall eine Präzipitationsreaktion nachgewiesen werden.

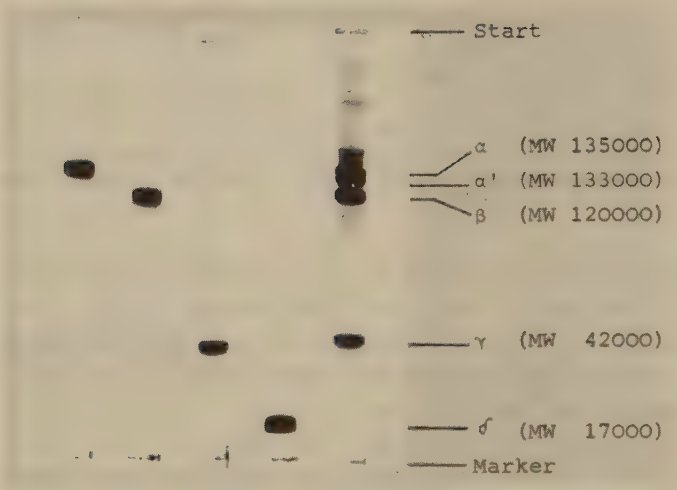


Abb. 9: Elektrophoretische Untersuchung der isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS nach 2.2.7.c
Acrylamidkonzentration: 8 %
Aufgetragene Proteinmengen: α 11 µg, β 14 µg, γ 7 µg, δ 16 µg
Anfärbung mit Coomassieblau

c) Sedimentationskoeffizienten (Reinheitskriterium für die Untereinheiten α und β):

Da es bisher nicht möglich war, die Untereinheiten α und β voneinander zu trennen, gibt es in der Literatur bisher keine Angaben über die S- Werte der reinen Untereinheiten. Trotzdem aber ist ein gleichmäßiges Sedimentationsverhalten ein Reinheitskriterium. HAYAKAWA et al. (1973) bestimmten den S- Wert einer Mischung der Untereinheiten im gleichen Puffersystem, das auch in dieser Arbeit benutzt wurde, auf $S_{20,W}$ = 5,5 S. Diese Angabe ist sicherlich ein Richtwert für die zu erwartenden Werte für die isolierten Untereinheiten α und β.

Um eine Quervernetzung der Untereinheiten über Disulfidbrücken zu vermeiden, werden die reduzierten -SH Gruppen des Cysteins mit Jodessigsäure carboxymethyliert (siehe

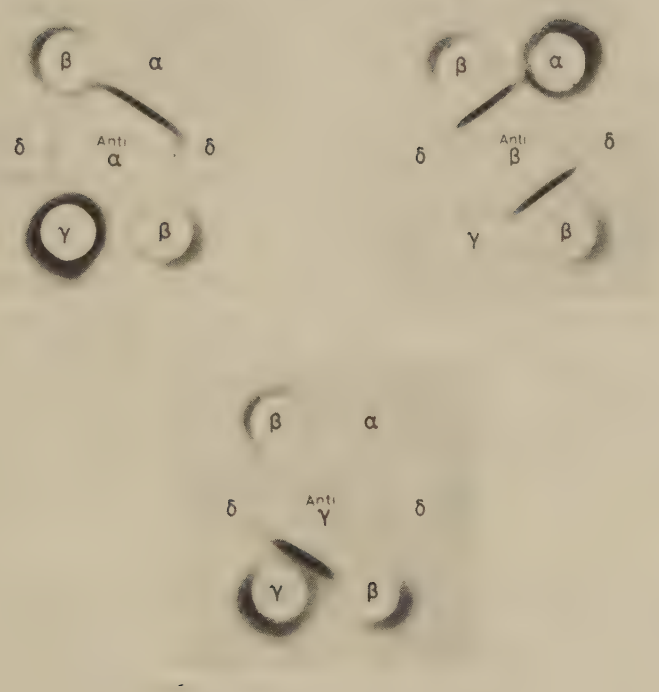


Abb. 10: Immundoppeldiffusion der isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase gegen monospezifische Antikörper.

Folgende Antikörper wurden eingesetzt: 1) Anti α (20 µl), Anti β (20 µl), Anti γ (20 µl). Von den Antigenen wurde aufgetragen: α 20 µg, β 12 µg, γ 7 µg, δ 13 µg.

2.1.18.). Weil die beiden isolierten Polypeptide im Gegensatz zum Proteingemisch (COHEN, 1973) in 6 M Guanidinhydrochlorid irreversibel ausfallen, werden die S- Läufe in einem SDS- Puffer durchgeführt.
Die carboxymethylierten Proteine (ca. 1 mg/ml) werden für 12 Stunden bei Raumtemperatur gegen 1 mM Phosphat / 100 mM NaCl / 0,1 % SDS, pH 9,0 dialysiert. Die Ultrazentrifugationsläufe werden bei 20° C durchgeführt, da in der Probe

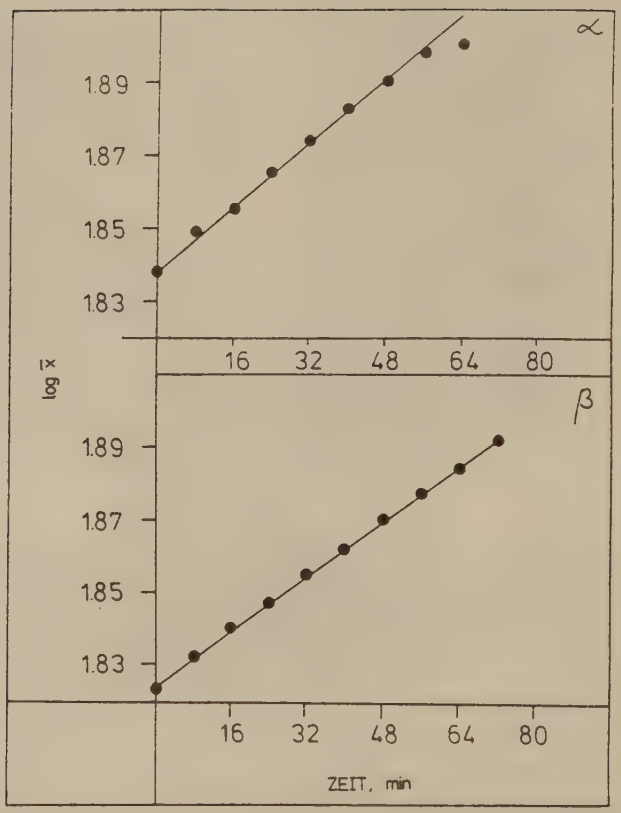


Abb. 11: Sedimentationsverhalten der gereinigten Untereinheiten α und β der Phosphorylase Kinase in Gegenwart von SDS.

Jeweils 1 mg der carboxymethylierten Untereinheiten (siehe 2.1.18.), die in 1 ml 1 mM Na_2HPO_4 / 100 mM NaCl / 0,1 % SDS, pH 9,0 gelöst sind, werden bei 20° C in der analytischen Ultrazentrifuge zentrifugiert (siehe 2.2.13.): α bei 53663 rpm, β bei 51939 rpm.
Die Berechnung der Sedimentationskoeffizienten erfolgt über das Computerprogramm PROGRAMM I (siehe 2.3.1.), die Berechnung auf Standardbedingungen nach 2.2.13.
X̄: Wanderungsstrecke der Protein- Lösungsmittel-Grenzschicht

mit der α- Untereinheit bei niedrigeren Temperaturen das SDS auskristallisiert. Obwohl dieser Effekt in der Probe mit der β- Untereinheit nicht beobachtet wurde, wird auch dieser Ultrazentrifugationslauf bei 20° C durchgeführt, um eindeutig vergleichbare Ergebnisse zu erzielen. Im Anschluß an die S- Wert- Bestimmung wird von den verwendeten Proben durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese in Gegenwart von SDS sichergestellt, daß die Polypeptide während der Dialyse und während des Ultrazentrifugationslaufes nicht degradiert worden sind.
Die Abbildung 11 zeigt, daß die α- Untereinheit über 56 Minuten und die β- Untereinheit über 72 Minuten gleichmäßig sedimentieren. Nach der Umrechnung der ermittelten S- Werte auf Normalbedingungen (siehe 2.2.13.) ergeben sich für die Untereinheiten folgende nahezu identische Sedimentationskoeffizienten: α: $S_{20,W}$ = 5,7 S
β: $S_{20,W}$ = 5,4 S.

d) Aminosäureanalyse (Reinheitskriterium für die γ- Untereinheit):

In der Literatur werden bisher nur die Aminosäureanalysen der γ- Untereinheit (COHEN, 1973) und der δ - Untereinheit (COHEN et al., 1978) beschrieben. In der Tabelle 2 wird der von uns ermittelten Aminosäureanalyse der γ- Untereinheit die von COHEN (1973) bestimmte Analyse dieser Untereinheit gegenübergestellt. Abgesehen von den Unterschieden bei den Aminosäuren Cystein (30 %), Lysin (9 %) und Isoleucin (6 %) liegen die Abweichungen zwischen den beiden Analysen in allen Fällen zwischen 0 und 5 %.
Als neues Ergebnis sind die Aminosäureanalysen der Untereinheiten α und βzu betrachten. Die drei Untereinheiten α, β und γ haben eine sehr ähnliche Aminosäurezusammensetzung. Die größten Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung zwischen den Untereinheiten α und β bestehen bei folgenden Aminosäuren: Threonin (Thr_α : Thr_β = 1,3), Serin (Ser_α : Ser_β = 1,3), Methionin (Met_α : Met_β = 1,4), Cystein (Cys_α : Cys_β = 0,7) und Tryptophan (Trp_α : Trp_β = 0,6). Die Aminosäureanalyse der γ- Untereinheit unterscheidet sich von

AMINOSÄURE	Mol / 100 Mol α	FEHLER, %	Mol / 100 Mol β	FEHLER, %	Mol / 100 Mol γ	FEHLER, %	Mol / 100 Mol γ (nach COHEN)
ASP	8,4	2,7	11,0	2,5	9,3	3,6	9,5
THR	5,3	2,8	4,1	7,9	5,0	4,9	5,1
SER	7,4	1,5	5,6	4,8	5,2	3,1	5,2
GLU	11,8	1,6	11,7	2,5	11,7	1,8	11,6
PRO	4,5	2,9	4,9	2,2	4,7	5,7	4,7
GLY	7,2	2,2	6,9	5,1	6,4	3,0	6,2
ALA	6,4	3,9	5,2	2,1	5,9	2,0	5,9
VAL	6,0	1,2	5,3	3,2	7,4	5,0	7,2
MET	2,9	3,8	2,1	5,8	2,6	5,7	2,7
ILE	5,4	3,2	5,7	4,9	5,2	5,9	4,9
LEU	11,2	2,6	11,0	1,3	9,7	4,3	9,5
TYR	3,3	2,7	4,0	2,5	4,4	6,3	4,6
PHE	3,5	3,1	3,8	2,1	4,6	5,8	4,8
HIS	3,0	2,0	2,5	5,7	2,7	3,2	2,5
LYS	5,7	3,0	6,4	1,3	6,6	2,3	6,0
ARG	5,8	2,1	6,2	4,5	6,3	7,0	6,5
CYS	1,7	3,8	2,6	4,3	1,6	6,5	2,1
TRP	0,7	6,2	1,2	7,0	---	---	1,0

Tab. 2: Aminosäureanalyse der α, β und γ-Untereinheiten der Phosphorylase Kinase.

Die Mittelwerte wurden berechnet aus jeweils 3 Analysen. Die Standardabweichung ist als Prozent Fehler angegeben. Die Proben wurden 24, 48 und 96 Stunden hydrolysiert und nach 2.2.10. analysiert. Die Cysteinbestimmung wurde nach 2.2.12., die Tryptophanbestimmung nach 2.2.11. vorgenommen. Unter Asp ist die Summe von Asparagin und Asparaginsäure, unter Glu diese aus Glutamin und Glutaminsäure aufgeführt.
Als Vergleich dient die Aminosäureanalyse der γ-Untereinheit von COHEN (1973).

den Aminosäuren der Untereinheiten α und β besonders in dem höheren Gehalt an Valin (Val_γ:Val_α = 1,2; Val_γ:Val_β = 1,4) und dem niedrigeren Gehalt an Leucin (Leu_γ:Leu_α = 0,9 und Leu_γ:Leu_β = 0,9).

e) Extinktionsquotient $A_{277\ nm} : A_{251\ nm}$ (Reinheitskriterium für die δ - Untereinheit):

Der Extinktionsquotient $A_{277\ nm} : A_{251\ nm}$ beträgt für reines Calmodulin 1,7 (Autric et al., 1980).
Zur Erhöhung der Ausbeute wird in dieser Arbeit die δ - Untereinheit nach der unter 4.1.1.a beschriebenen Methode präpariert. Bei dieser Isolierung wird die von COHEN et al. (1978) vorgeschlagene Ionenaustauschchromatographie nicht durchgeführt. Die so präparierte δ- Untereinheit besitzt einen Extinktionsquotienten $A_{277\ nm} : A_{251\ nm}$ von 1,61. Wie die Abbildung 9 zeigt, ist diese geringfügige Verschlechterung des Quotienten nicht auf eine Kontamination mit anderen Proteinen zurückzuführen. Vielmehr wird die Anwesenheit von Nucleinsäuren, die aber für unsere Messungen bedeutungslos sind, die Veränderung des Quotienten bewirken.

4.1.2. Abänderungen bekannter Präparationsmethoden zur Isolierung weiterer löslicher Muskelenzyme für die Erfordernisse dieser Arbeit

In die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit werden neben der Phosphorylase Kinase zwei weitere Enzyme der Glycogenolyse - die Phosphorylase b und die Glycogensynthase - und ein Enzym der Glycolyse - die Glycerinaldehyd- 3- phosphat- Dehydrogenase (GAPDH) - einbezogen. Präparationsmethoden für diese 3 Enzyme wurden bereits in der Literatur beschrieben und werden für die Erfordernisse dieser Arbeit (Ausgangsmaterial, Reinheit, Aktivität) nur unwesentlich abgewandelt.

a) GAPDH:

Die GAPDH wird aus lyophilisierter, gemischter Skelettmuskulatur präpariert (siehe 2.1.6.), die direkt nach der Schlachtung der Kaninchen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren, lyophilisiert und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C gelagert worden ist.

Die GAPDH wird nach fünfmaliger Umkristallisation als reines Enzym betrachtet (CORI et al., 1948).

b) Glycogensynthase:
Das Ausgangsmaterial für die Präparation der Glycogensynthase (siehe 2.1.7.) ist der Protein- Glycogen- Komplex, der als Sediment bei dem Ultrazentrifugationslauf (110000 x g) während der Präparation der Phosphorylase Kinase (siehe 2.1.3.) anfällt. Dieses Sediment wird bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C gelagert.
Die Glycogensynthase besitzt vor der endgültigen Reinigung durch präparative Gelelektrophorese eine spezifische Enzymaktivität von ca. 10 U/mg (NIMMO et al., 1976). Das nach der präparativen Elektrophorese in denaturierter Form vorliegende Enzym ist zu etwa 98 % rein (densitometrische Auswertung eines Polyacrylamidgeles in Gegenwart von SDS, siehe Abbildung 12).

c) Phosphorylase b:
Wie bei der Präparation der Glycogensynthase ist auch bei dieser Präparation der Protein- Glycogen- Komplex das Ausgangsmaterial (s.o.). Die in dieser Arbeit angewandte Präparationsmethode für die Phosphorylase b wird unter 2.1.4.b beschrieben. In den Fällen, in denen die Phosphorylase b nach der Präparation noch mit niedermolekularen Proteinen verunreinigt ist (Polyacrylamidgel in Gegenwart von SDS), wird das Enzym mit SDS/ME denaturiert und über die präparative Elektrophorese in Gegenwart von SDS über ein Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 7 % nachgereinigt (siehe 2.1.12.).
Die isolierte Phosphorylase b hat im nativen Zustand eine spezifische Enzymaktivität zwischen 73 und 80 U/mg und besitzt eine 96%ige Reinheit (densitometrische Auswertung eines Polyacrylamidgeles in Gegenwart von SDS, siehe Abbildung 12).

4.1.3. Abänderung bekannter Präparationsmethoden zur Isolierung membrangebundener Muskelenzyme für die Erfordernisse dieser Arbeit

Neben den bereits genannten Enzymen des löslichen Kompartiments der quergestreiften Skelettmuskelzelle sollen in dieser Arbeit auch Enzyme des membrangebundenen Kompartimentes untersucht werden. Es handelt sich hierbei um die beiden Proteinhauptkomponenten der Vesikel des sarkoplasmatischen Reticulum, der Ca^{2+}- Transport- ATPase und des Calsequestrins (MAC LENNAN und HOLLAND, 1975).
Auch diese Präparationsmethoden wurden bereits in der Literatur beschrieben und werden für die Erfordernisse dieser Arbeit nur unwesentlich abgewandelt.

a) Calsequestrin:
Das Calsequestrin wird in einer Präparation (siehe 2.1.8.) zusammen mit der Glycogensynthase aus dem bei der Präparation der Phosphorylase Kinase als Sediment des Ultrazentrifugationslaufes (110000 x g, siehe 2.1.3.) anfallenden Protein- Glycogen- Komplex gewonnen. Da das Calsequestrin nach der Präparation noch mit Glycogensynthase verunreinigt ist, wird noch eine Endreinigung über die präparative Gelelektrophorese vorgenommen.
Das Calsequestrin besitzt in nativer Form vor der Endreinigung eine spezifische Phosphorylase Kinase- Enzymaktivität von ca. 8 U/mg (VARSANYI und HEILMEYER, 1979). Nach der Endreinigung ist das Calsequestrin zu etwa 98 % rein (densitometrische Auswertung eines Polyacrylamidgeles in Gegenwart von SDS, siehe Abbildung 13).

b) Ca^{2+}- Transport- ATPase:
Ausgangsmaterial für die Präparation der Ca^{2+}- Transport- ATPase sind die "roh" Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulum, die aus lyophilisierter, gemischter Skelettmuskulatur nach der Methode 2.1.5. präpariert werden. Bevor die Ca^{2+}- Transport- ATPase aus diesen Vesikeln nach der Methode 2.1.11. isoliert werden kann, müssen adsorbierte Proteine

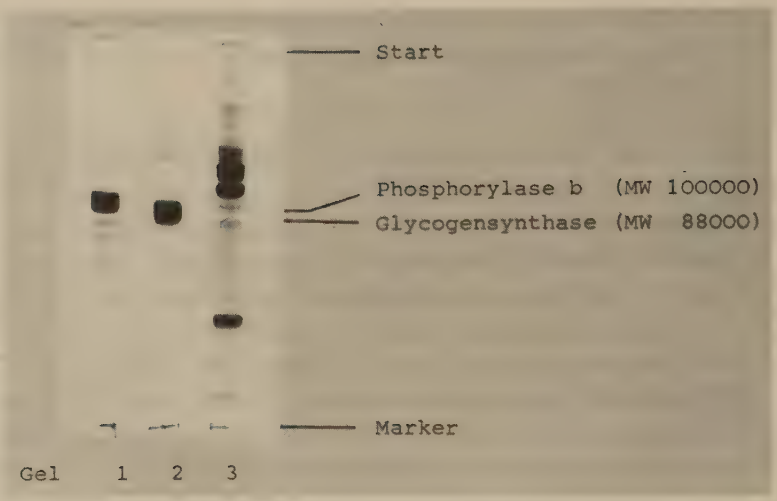


Abb. 12: Elektrophoretische Untersuchung der Phosphorylase b (Gel 1) und der Glycogensynthase (Gel 2) auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS nach 2.2.7.c.

Acrylamidkonzentration: 8 %
Aufgetragene Proteinmengen: Phosphorylase b 18 µg, Glycogensynthase: 20 µg, Anfärbung mit Coomassieblau, Referenzprotein: Phosphorylase Kinase (Gel 3, 34 µg),

nach 2.1.11. entfernt werden.

Die aus gereinigtem sarkoplasmatischen Retikulum isolierte Ca^{2+}- Transport- ATPase ist zu 98 % rein (densitometrische Auswertung eines Polyacrylamidgeles in Gegenwart von SDS, siehe Abbildung 13).

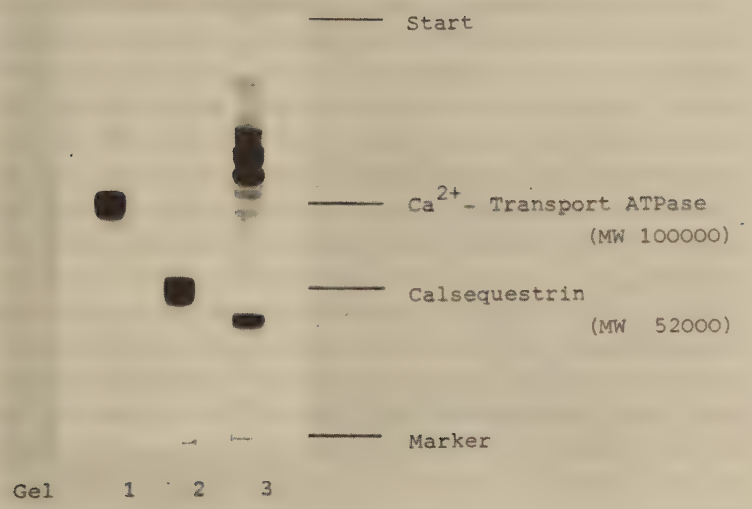


Abb. 13: Elektrophoretische Untersuchung der Ca^{2+}- Transport- ATPase (Gel 1) und des Calsequestrins (Gel 2) auf Polyacrylamidgelen in Gegenwart von SDS nach 2.2.7.c.

Acrylamidkonzentration: 8 %
Aufgetragene Proteinmengen: Ca^{2+}- Transport- ATPase 21 µg, Calsequestrin 18 µg, Anfärbung mit Coomassieblau, Referenzprotein: Phosphorylase Kinase (Gel 3, 34 µg),

4.1.4 Präparation von freiem Leucin aus Serum und Rohextrakt

Wie bereits unter 3. beschrieben, werden die durch Pulsmarkierung ermittelten relativen Turnoverraten eines Proteins durch die Höhe der spezifischen Radioaktivität des Leucins im Präcursorpool beeinflußt. Abgesehen von eventuell vorhandenen kleineren intrazellulären Kompartimenten gibt es in der Skelettmuskulatur 2 große Präcursorpools: das intrazelluläre und das extrazelluläre Aminosäurepool. Um die spezifische Radioaktivität des Leucins in diesen beiden Kompartimenten zu bestimmen, wird das freie Leucin aus dem Serum (extrazelluläres Pool) und aus Muskelrohex-

trakt (extrazelluläres und intrazelluläres Pool) isoliert. Für die Gewinnung des freien Leucins wird deshalb von jedem Pulsmarkierungsexperiment das anfallende Blut gesammelt, nach Gerinnung abzentrifugiert und das Serum bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C gelagert. Von dem Rohextrakt, der Ausgangspunkt jeder Präparation der Phosphorylase Kinase ist (siehe 2.1.3.), werden jeweils ca. 50 ml entnommen und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -20° C gelagert.

Obwohl in der Literatur viele Isolierungsmethoden für Leucin aus tierischen Extrakten beschrieben worden sind (REGIER und KAFATOS, 1971; MORTIMORE und MONDON, 1970; JARZEBINSKI und ROLSKI, 1969; MATUSIAK und KAROLAK, 1970), war die Präparation dieser Aminosäure wesentlich schwieriger als erwartet. Es wurde unter anderem versucht, die genannten Methoden zu reproduzieren, doch es führte keine zum Ziel. Relativ rasch gelang es, Leucin aus Serum und Rohextrakt so weit zu reinigen, daß es auf einem Chromatogramm nach Aminosäureanalyse homogen erschien. Dies bedeutet aber nur, daß in der Probe keine weiteren ninhydrinpositiven Substanzen neben dem Leucin enthalten sind.

Es konnte aber gezeigt werden, daß in dem Leucin noch störende, radioaktiv markierte, ninhydrinnegative Substanzen enthalten sein mußten, da nach einer Ionenaustauschchromatographie über DC 6 A (Durrum) der genannten Probe die spezifische Radioaktivität des Leucins, das bei dieser Chromatographie in mehreren Fraktionen anfällt, unterschiedlich ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Methode entwickelt, nach der einheitliches, reines Leucin sowohl aus Serum als auch aus Rohextrakt isoliert werden kann.

Diese Methode umfaßt folgende 4 Reinigungsschritte:

Enteiweißung: Zur Entfernung der Proteine und größeren Peptide werden 10 ml Extrakt (Serum oder Rohextrakt) mit 0,3 g fester Sulfosalicylsäure (3 % Endkonzentration) versetzt und für 10 Minuten auf Eis stehen gelassen. Anschließend werden die ausgefällten Proteine für 15 Minuten bei 15000 x g abzentrifugiert.

Gelfiltration: Kleinere Peptide, Nucleinsäuren und die Sulfosalicylsäure werden durch Gelfiltration von den Aminosäuren abgetrennt. Dazu wird der enteiweißte Extrakt (9,6 ml) über eine Sephadex G 10- Säule (2 cm Ø x 88 cm Gelhöhe) gegeben, die mit 50 mM HCOOH äquilibriert ist. Wie die Abbildung 14 zeigt, wird das Leucin und andere bei 280 nm nicht absorbierende Komponenten kurz hinter dem Ausschlußvolumen eluiert. Mit dem Ausschlußvolumen und hinter dem inneren Volumen der Säule, jedoch gut von den Leucin enthaltenden Fraktionen abgetrennt, werden bei 280 nm absorbierende Substanzen eluiert. Die Fraktionen, die Radioaktivität (Leucin) enthalten, werden vereinigt und im Rotationsverdampfer unter Wasserstrahlvakuum bis zur Trockene eingeengt.

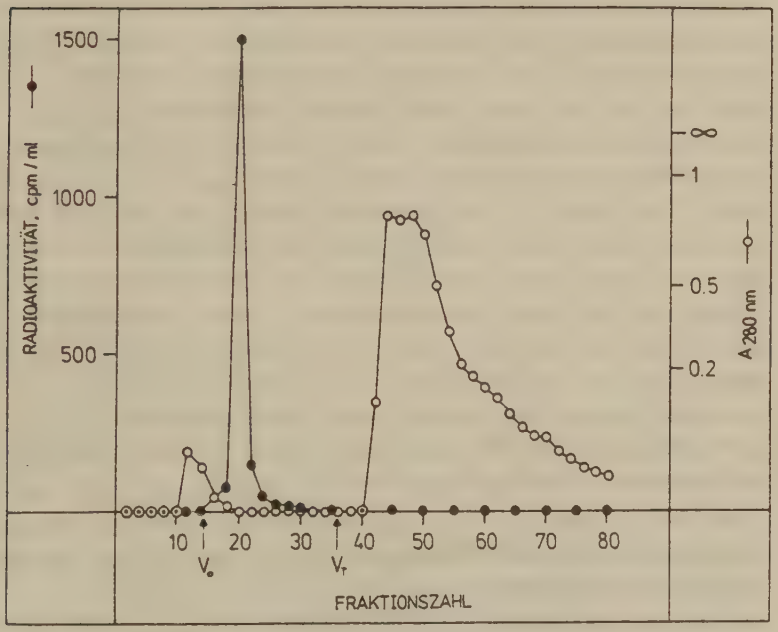


Abb. 14: Gelfiltration von enteiweißtem Serum.

9,6 ml enteiweißtes Serum des Turnoverexperimentes des 0,5. Tages werden über eine Sephadex G 10-

Säule (2 cm Ø x 88 cm Gelhöhe) gelfiltriert, die mit 50 mM HCOOH, pH 2,75 mit einer Pumpgeschwindigkeit von 56 ml/h eluiert wird. Das Fraktionsvolumen beträgt 4,4 ml. Die Fraktionen, die Radioaktivität enthalten, werden zur weiteren Aufarbeitung vereinigt.

Hochspannungselektrophorese: Eine Abtrennung von basischen Peptiden und Aminosäuren wird mit der Hochspannungselektrophorese erreicht. Die Probe wird in 1 ml 2,5 % Ameisensäure / 7,8 % Essigsäure, pH 1,85 aufgenommen, und der Hochspannungselektrophorese unterzogen wie unter 2.1.13. beschrieben. Nach dem Eluieren der Leucin enthaltenden Fraktion aus dem Chromatographierpapier wird diese Lösung wieder im Rotationsverdampfer unter Wasserstrahlvakuum zur Trockene eingeengt.

Ionenaustauschchromatographie: Die nach der Hochspannungselektrophorese vorliegende Trockensubstanz enthält neben sauren Peptiden noch folgende Aminosäuren in Mengen zwischen 500 und 1000 nMol: Leucin, Isoleucin, Valin, Alanin, Glycin, Glutamin, Serin, Threonin und Asparagin. Die Ionenaustauschchromatographie über eine DC 6 A (Durrum)-Säule (0,6 cm Ø x 27 cm Harzhöhe) automatisiert über einen Aminosäureanalysator (siehe 2.2.10.) durchgeführt. Dafür wird die Probe in 0,5 ml Puffer A (siehe 2.2.10.) aufgenommen und auf zwei Probenschleifen (max. Fassungsvermögen einer Schleife: 0,3 ml) des Probengebers des Aminosäureanalysators (Biotronik, Serie 6000) gegeben. Die Elution der Aminosäuren erfolgt mit Trilitiumcitratpuffern steigenden pH- Wertes sowie durch schrittweise Erhöhung der Säulentemperatur von 37- 60° C. Die Tabelle 3 zeigt die einzelnen Schritte, die zur präparativen Trennung der Aminosäuren programmiert worden sind. Das Leucin wird durch den Puffer C eluiert.
Das Volumen des Gesamteluates beträgt 117 ml bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 35 ml/h. Die gesamte Chromatographie dauert 200 Minuten. Für die präparative Auftrennung von Aminosäuregemischen wird die Detektionseinheit des Aminosäureanalysators (Ninhydrinpumpe, Photometer, Integra-

tor und Schreiber) abgeschaltet. Direkt an den Säulenausgang wird ein Fraktionssammler angeschlossen, der 2ml große Fraktionen auffängt. Die Aminosäuren in den einzelnen Fraktionen werden anschließend durch eine Aminosäureanalyse identifiziert und analysiert.
Die Abbildung 15 zeigt das Elutionsprofil der Ionenaustauschchromatographie über DC 6 A. Zu sehen sind zwei kleinere und ein größerer Radioaktivitätsgipfel. Nur in den Fraktionen dieses großen Radioaktivitätsgipfels wird Leucin nachgewiesen (Fraktionen 37- 43).

		SCHRITT										
	FUNKTION	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	Puffer A	x	x							x	x	
2	Puffer B			x								
3	Puffer C				x	x						
4	Puffer D						x					
5	Puffer E							x				
6	NaOH								x			
7	Pufferpumpe	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	
8	Ninhydrin- Pumpe											
9	T_1 = 37° C	x	x	x	x						x	x
10	T_2 = 54° C					x	x	x				
11	T_3 = 65° C								x	x		
12	Schreiber											
13	Kühlwasser- Ventil										x	
14	Probenaufgeber	x	x									
15	Sicherheitsabschaltung	x	x	x	x	x	x	x	x			
16	Integrator											
	Minuten	5	5	40	10	30	10	100	25	25	40	5

Tab. 3: Programm zur präparativen Isolierung von Aminosäuren durch Ionenaustauschchromatographie über DC 6 A (Durrum) mit dem Aminosäureanalysator.

Schritt 1- 2: Probenauftrag auf die Säule
Schritt 3- 7: Elution der Aminosäuren
Schritt 8- 11: Regeneration der Ionenaustauscher-Säule
Das Leucin wird durch den Puffer C eluiert.

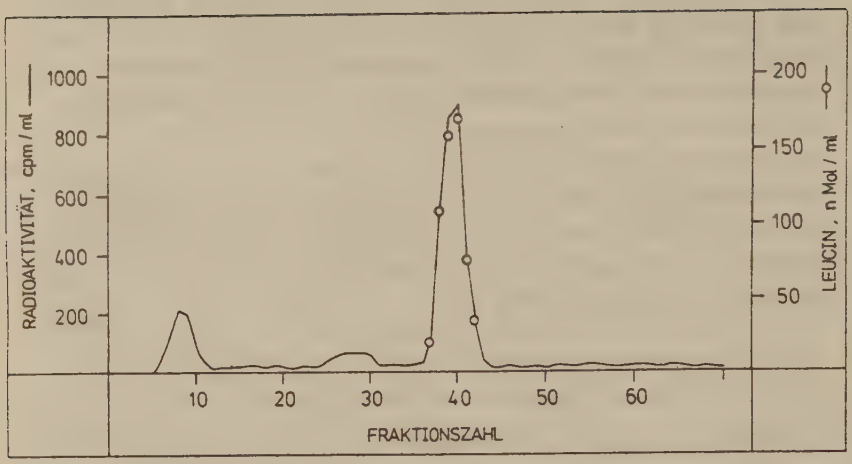


Abb. 15: Ionenaustauschchromatographie zur Isolierung von Leucin aus Serum.

10 ml Serum werden wie unter 4.1.4. beschrieben aufgearbeitet. Der nach der Hochspannungselektrophorese anfallende Serumanteil wird in 0,4 ml Puffer A aufgenommen und auf den Aminosäureanalysator gegeben (siehe 2.2.10.). Die Trennung der Aminosäuren erfolgt über eine DC 6 A- Säule (0,6 cm Ø x 27 cm Harzhöhe). Eluiert wird mit Trilitiumcitratpuffern steigenden pH- Wertes sowie durch schrittweise Erhöhung der Säulentemperatur (siehe Tabelle 3).

Nach diesen 4 Reinigungsschritten genügt das isolierte Leucin den für die durchzuführenden Messungen erforderlichen Reinheitskriterien.

Zur Erstellung von Reinigungstabellen für die Isolierung von Leucin aus Serum und Rohextrakt wird von dem Produkt eines jeden Reinigungsschrittes eine Aminosäureanalyse durchgeführt (siehe Abbildung 16), anhand der die "Reinheit" des Leucins berechnet werden kann. Sie stellt den Quotienten aus der Fläche des Leucinpeaks zur Gesamtfläche aller Peaks des Chromatogramms (ausgenommen: NH_3- Peak) X 100 % dar und gibt an, mit wieviel Prozent das Leucin in der untersuchten Probe enthalten ist. Die "Reinheit" und die "Anreicherung" (siehe Tabelle 4 und 5) stellen nur

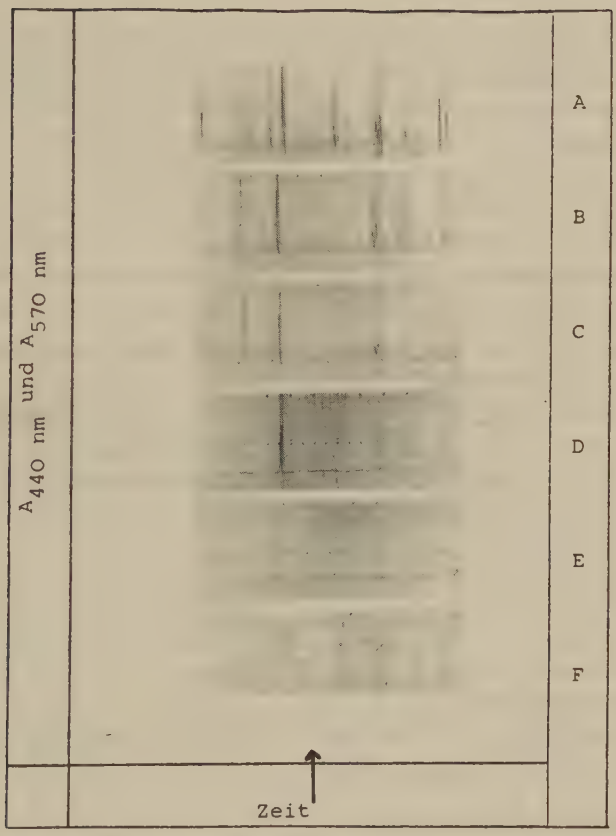


Abb. 16: Aminosäureanalysen der Produkte der einzelnen Reinigungsschritte für die Isolierung von Leucin aus Rohextrakt.

Für die Analysen A- D wurden jeweils 50 µl Probe der einzelnen Reinigungsprodukte, die nach jedem Schritt wieder auf das Ausgangsvolumen (10 ml) mit Wasser aufgefüllt wurden, auf den Aminosäure-Analysator gegeben und nach 2.2.10. analysiert. Für die Analyse E wurden 0,2 ml Probe auf den Analysator gegeben.

F: Standard (Gemisch der physiologischen Aminosäuren, 10 nMol/Aminosäure)
A: Rohextrakt (Ausgangsprodukt)
B: enteiweißter Rohextrakt
C: Probe nach Gelfiltration (Sephadex G 10)
D: Probe nach Hochspannungselektrophorese
E: Probe nach Ionenaustauschchromatographie

SCHRITT	LEUCIN, nMol	AUSBEUTE, %	REINHEIT, %	ANREICHERUNG
enteiweißtes Serum	725	100	2,7	1,0
Gelfiltration	717	99	3,3	1,2
Hochspannungselektrophorese	457	63	3,9	1,4
Ionenaustauschchromatographie	236	33	100	36,6

Tab. 4: Reinigungstabelle für die Isolierung von Leucin aus Serum.

Es werden 10 ml Serum nach der in diesem Kapitel beschriebenen Methode aufgearbeitet. Die "Reinheit" wird nach einer Aminosäureanalyse der jeweiligen Zwischenprodukte der Reinigungsschritte berechnet. Sie gibt den apparenten prozentualen Gehalt an Leucin in der Probe an.

SCHRITT	LEUCIN, nMol	AUSBEUTE, %	REINHEIT, %	ANREICHERUNG
enteiweißter Rohextrakt	480	100	1.3	1.0
Gelfiltration	438	91	1.4	1.1
Hochspannungselektrophorese	365	76	3.5	2.7
Ionenaustauschchromatographie	111	23	100	76,9

Tab. 5: Reinigungstabelle für die Isolierung von Leucin aus Rohextrakt.

Es werden 10 ml Rohextrakt nach der in diesem Kapitel beschriebenen Methode aufgearbeitet. Weitere Einzelheiten werden in der Legende zur Tabelle 4 beschrieben.

apparente Werte dar, weil bei ihrer Berechnung die molaren Extinktionskoeffizienten sämtlicher Aminosäure- Ninhydrin-Farbkomplexe willkürlich einander gleichgesetzt werden. Wie die Tabelle 4 zeigt, kann homogenes Leucin, das heißt Leucin, in dem keine weiteren ninhydrinpositiven Substanzen und auch keine ninhydrinnegativen, radioaktiven Verunrein-

gungen mehr enthalten sind, aus dem Serum mit einer Ausbeute von 33 % gewonnen werden, wobei es 37fach angereichert wird. Die Ausbeute bei der Isolierung von Leucin aus Rohextrakt liegt mit 23 % etwas niedriger (siehe Tabelle 5). Dafür aber muß das Leucin in diesem Fall 77fach und damit zweimal so stark angereichert werden als beim Serum.
Obwohl das Leucin in einigen Fraktionen nach der Ionenaustauschchromatographie noch mit Isoleucin kontaminiert ist, besitzen die Quotienten aus der Radioaktivitätskonzentration und der Leucinmenge in diesen Fraktionen einen konstanten Wert (siehe Tabelle 6). Aus diesem Ergebnis und der Tatsache, daß die Isoleucinkonzentration in den Fraktionen unterschiedlich groß ist, muß gefolgert werden, daß neben dem Leucin keine fremden radioaktiven Substanzen mehr in den Proben enthalten sind. Diese mit Isoleucin kontaminierten Fraktionen wurden bei der Berechnung der Ausbeute für die Reinigungstabellen (Tabelle 4 und 5) nicht berücksichtigt.

FRAKTIONSZAHL	LEUCIN, nMol/ml	ISOLEUCIN, nMol/ml	ISOLEUCIN, %	SPEZ. RADIOAKTIVITÄT, dpm/µMol Leu
39	159	157	50	5420
40	171	66	28	5267
41	74	2	3	5557
42	36	0	0	5170

Tab. 6: Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins nach der Ionenaustauschchromatographie in den Fraktionen, in denen das Leucin noch mit 0- 50 % Isoleucin kontaminiert ist.

Proben, in denen neben Leucin und Isoleucin noch andere Aminosäuren vorhanden sind, werden verworfen.

4.2. Messung der spezifischen Radioaktivität von Leucin in Proteinen, Serum und Rohextrakt nach Pulsmarkierung

4.2.1. Grundlagen der Radioaktivitätsmessung

Vor der Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den isolierten Polypeptiden müssen noch zwei Kontrollexperimente und die Optimierung der Bedingungen zur simultanen Messung der Isotope ^{3}H und ^{14}C durchgeführt werden. Von der Präparation der Phosphorylase Kinase bis zur endgültigen Aufarbeitung in die einzelnen Untereinheiten vergingen in einigen Fällen 2 Jahre. Während dieser Zeit wurde das Enzym in lyophilisierter Form bei -20° C aufbewahrt. Um auszuschließen, daß sich das Enzym während dieser relativ langen Lagerung verändert hat, oder eventuell ein ^{3}H-Austausch unter den Polypeptiden stattgefunden hat, wird als Kontrolle das Pulsmarkierungsexperiment des 0,5. Tages mit folgender Änderung wiederholt: in diesem Fall liegt zwischen Enzympräparation und Isolierung der Untereinheiten kein Zeitraum von 2 Jahren mehr, sondern diese Arbeitsschritte werden zeitlich unmittelbar hintereinander vorgenommen. Die Tabelle 7 zeigt einerseits, daß sich die spezifische Radioaktivität des Leucins während der langen Lagerung nicht verändert hat und andererseits die gute Reproduzierbarkeit der Pulsmarkierungsexperimente.
Eine Voraussetzung für die Gültigkeit der Pulsmarkierungsmethode ist die, daß keine radioaktiven metabolischen Produkte des Leucins zur Markierung anderer Aminosäuren führen. Deshalb wird ein Kontrollexperiment mit der Fragestellung durchgeführt, ob neben dem Leucin auch nach längerer Inkorporationsdauer andere Aminosäuren radioaktiv markiert sind, und ob Fremdsubstanzen wie z.B. Spuren anderer Aminosäuren im ^{3}H- Leucin eventuell zur Markierung von Proteinen führen. Zur Beantwortung dieser Frage wird ca. 1 mg mit ^{3}H- Leucin markierter Phosphorylase Kinase des Turnoverexperimentes vom 7. Tag für 48 Stunden mit 6 N HCl bei 110° C hydrolysiert und anschließend einer Ionenaustauschchromatographie über DC 6 A (Durrum) unterzogen (siehe

UNTEREINHEIT	PRÄPARATION I			PRÄPARATION II		
	PROTEIN, mg	ZÄHLAUSBEUTE, %	SPEZ. RAD., dpm/mg	PROTEIN, mg	ZÄHLAUSBEUTE, %	SPEZ. RAD., dpm/mg
α / β / γ / δ	0,87	36,27	1850	2,04	34,62	1556
α / β	1,00	36,01	1411	1,21	34,95	1476
α	0,31	36,93	1366	0,74	34,71	1415
β	0,24	36,78	1215	0,98	34,68	1281
γ	0,51	36,94	1110	1,63	35,02	1085
	----	----	----	2,07	36,61	548

Tab. 7: Untersuchung des Einflusses der Lagerung auf die spezifische Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase.

2 Phosphorylase Kinase- Präparationen (Turnoverexperiment des 0,5. Tages) werden unter völlig identischen Bedingungen durchgeführt. Während sich bei der Präparation II die Aufarbeitung in die Untereinheiten und die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in diesen sofort anschließt, wird die Enzympräparation I vor der weiteren Aufarbeitung in lyophilisierter Form für 2 Jahre bei -20° C gelagert. Die Zählausbeuten werden durch Verwendung eines internen Standards bestimmt (siehe 2.2.9.a).

4.1.4.). Anschließend werden in den einzelnen Fraktionen die Aminosäuren und Radioaktivitätsmengen bestimmt. Wie die Abbildung 17 zeigt, befinden sich 91 % der eluierten Radioaktivitätsmenge im Leucin. Die verbleibenden 9 % der Gesamtradioaktivität, die in den Fraktionen 5- 9 enthalten sind, können nicht aus Aminosäuren stammen, da zu diesem frühen Zeitpunkt keine physiologischen Aminosäuren eluiert werden. Wahrscheinlich handelt es sich um kleinere, nicht hydrolysierte, Leucin enthaltende Peptide der Phosphorylase Kinase. Bei dieser Kontrolle werden die Aminosäuren Cystein und Tryptophan nicht erfaßt, da sie durch die saure Hydrolyse zerstört werden.

Bei der Durchführung des Doppelmarkierungsexperimentes

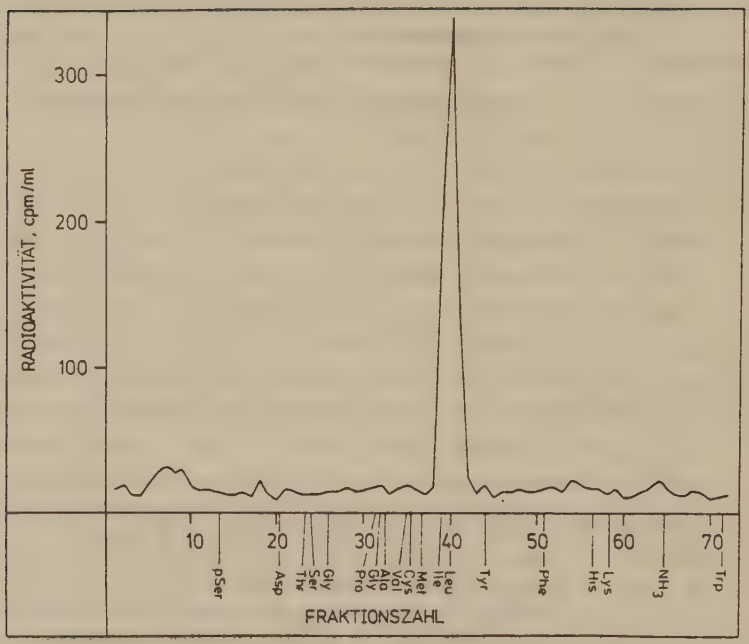


Abb. 17: Ionenaustauschchromatographie von hydrolysierter ^{3}H- markierter Phosphorylase Kinase.

3,7 mg Phosphorylase Kinase in lyophilisierter Form werden in 1m 6 N HCl für 48 Stunden bei 110° C hydrolysiert. Nach dem Absaugen der HCl wird das Hydrolysat in 1 ml Puffer A (siehe 2.2.10.) aufgenommen. Hiervon werden 0,27 ml (ca. 1 mg Protein) der Ionenaustauschchromatographie unterzogen (siehe 4.1.4.). Von den 2 ml großen Fraktionen werden 0,5 ml zur Bestimmung der Radioaktivitätsmenge durch Szintillationsmessung benutzt. Eingezeichnet sind auch die Elutionsvolumina der in der Phosphorylase Kinase enthaltenen Aminosäuren.

müssen die Isotope ^{3}H und ^{14}C, die mit einer unterschiedlichen Zählausbeute gemessen werden, in einer Probe nebeneinander bestimmt werden. Zur Ermittlung der Zählausbeuten müßte mit 2 internen Standards gearbeitet werden, was jedoch mit technischen Schwierigkeiten verbunden ist. Deshalb wird für jedes Isotop eine Quenchkurve aufgenommen.

Dazu werden aus einer Stammlösung des jeweiligen Isotops eine definierte Menge Radioaktivität vorgelegt, zu der anschließend steigende Volumina einer 0,01 %igen SDS- Lösung (Lösungsmittel der Polypeptide bei der Radioaktivitätsmessung) hinzugegeben werden. Auf diese Weise wird eine verschieden starke Verschiebung der Energie des Emissionsspektrums erreicht, aus der die Quenchkurven errechnet werden können.
Die beiden Quenchkurven sind in der Abbildung 18 dargestellt. Beide zeigen bei halblogarithmischer Auftragung einen linearen Verlauf, wobei die ^{3}H- Quenchkurve (offene Punkte) etwas steiler abfällt als die ^{14}C- Quenchkurve (geschlossene Punkte). Durch eine lineare Regressionsanalyse können beide Quenchkurven mit einer Ausgleichsgeraden angepaßt werden, wobei in beiden Fällen der Korrelationskoeffizient (r^2) 0,99 beträgt (R: Zählausbeute, F: Quenchfaktor):

^{3}H- Quenchkurve: $F = (-\ln R + 0{,}36) / 0{,}67$

^{14}C- Quenchkurve: $F = (-\ln R + 0{,}17) / 0{,}48$

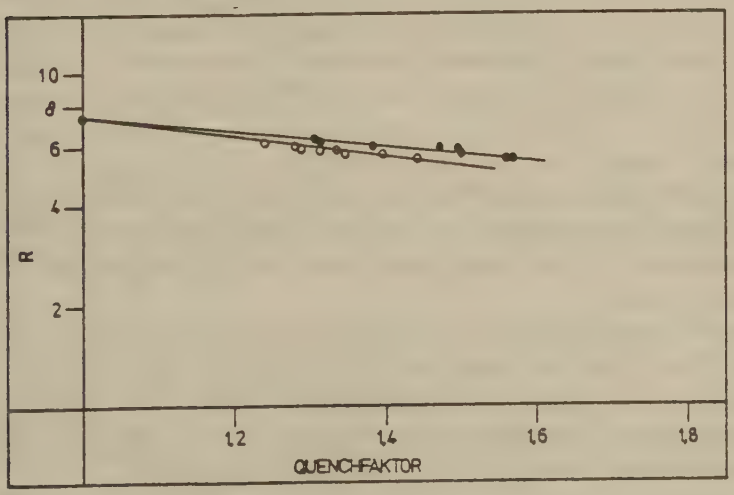


Abb. 18: ^{3}H- und ^{14}C- Quenchkurve

Zu markiertem n- Hexadecan (^{3}H: ca. 7000 cpm, ^{14}C: ca. 4600cpm), jeweils gelöst in 15 ml Toluol- Triton- Szintillator, werden in getrennten Ansätzen steigende Volumina 0,01 % SDS gelöst in Wasser zugegeben.
Die offenen Punkte kennzeichnen die ^{3}H- Quenchkurve, die geschlossenen Punkte die ^{14}C- Quenchkurve.

Bei dem synchronen Messen der Strahlungsintensitäten der Isotope ^{3}H und ^{14}C in einer Probe muß ferner davon ausgegangen werden, daß sich die beiden Emissionsspektren erfahrungsgemäß so überschneiden, daß ein Teil der ^{14}C- Radioaktivität im ^{3}H- Kanal mitgemessen wird, während eine umgekehrte Beeinflussung meistens nicht gefunden wird. Aus diesem Grund muß der jeweilige Prozentsatz der Radioaktivität von der Gesamtmenge bestimmt werden, der im Kanal des anderen Isotops gemessen wird.
Zur Bestimmung der Radioaktivitätsmenge des Isotops ^{14}C, die im ^{3}H- Kanal gemessen wird, werden steigende Mengen dieses Isotops in Szintillationsgläschen gegeben und wie unter 2.2.9.b beschrieben gezählt. Nach Quenchkorrektur für die gemessenen Radioaktivitätsmengen im ^{14}C- Kanal (= 100 %) wird die hiervon im ^{3}H- Kanal gemessene Radioaktivitätsmenge prozentual bestimmt. In einem entsprechenden Experiment wird der prozentuale Anteil der ^{3}H- Radioaktivitätsmenge bestimmt, die im ^{14}C- Kanal gemessen wird. Wie aus der Abbildung 19 entnommen werden kann, werden bei einem Einsatz von ca. 100- 14000 dpm ^{14}C- Radioaktivität im ^{3}H- Kanal konstant 21 % dieser Radioaktivitätsmenge gemessen. Umgekehrt tritt bei einem Einsatz von ca. 50- 20000 dpm ^{3}H- Radioaktivität keine Beeinflussung des ^{14}C- Kanales ein.
Nach diesen Befunden müssen die Werte der gemessenen ^{3}H- cpm von Proben des Doppelmarkierungsexperimentes um den Quenchfaktor und die mitgezählten 21 % der ^{14}C- dpm korrigiert werden, während bei den gezählten ^{14}C- dpm nur der Quenchfaktor berücksichtigt zu werden braucht.

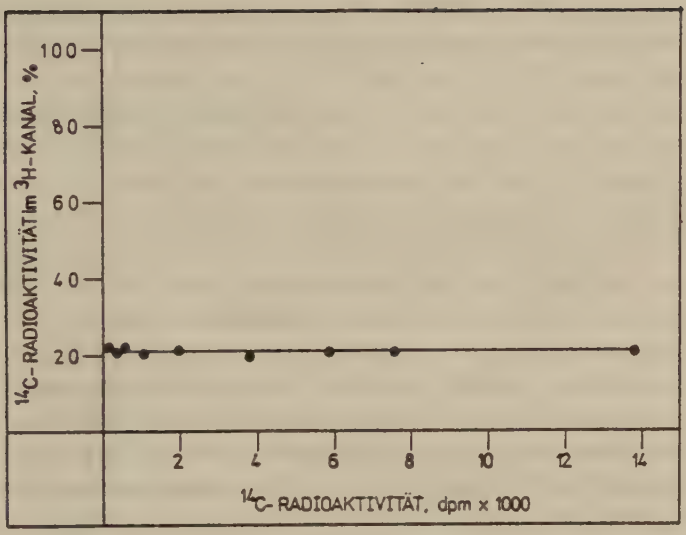


Abb. 19: Beeinflussung des ^{3}H- Kanals durch ^{14}C- markierte Proben.

Steigende Volumina einer Stammlösung von ^{14}C-markiertem n- Hexadecan (ca. 10000 dpm/ml) gelöst in Toluol- Triton Szintillator werden vorgelegt, mit dem gleichen Szintillator auf ein Endvolumen von 6,5 ml aufgefüllt und nach 2.2.9.b gezählt. Der prozentuale Anteil der Radioaktivität, der im ^{3}H-Kanal gemessen wird, zur eingesetzten Radioaktivitätsmenge (dpm im ^{14}C- Kanal) wird berechnet.

4.2.2. Messung der spezifischen Radioaktivität des freien Leucins in dem extrazellulären und intrazellulären Aminosäurepool der Muskelzelle

Die Halbwertszeiten von Proteinen, ermittelt aus Turnoverexperimenten, die ein Recycling der Aminosäuren nicht berücksichtigen, sind erfahrungsgemäß zu groß.
Um wirkliche Halbwertszeiten in den untersuchten Proteinen über den mathematischen Ansatz von ZAK et al. (1979) berechnen zu können, muß die hierfür benötigte spezifische Radioaktivität des Leucins in den entsprechenden Präcursorpools gemessen werden.

Da aber nicht bekannt ist, aus welchem Aminosäurepool die untersuchten Proteine synthetisiert werden, wird zunächst die spezifische Radioaktivität des freien Leucins in dem intrazellulären und extrazellulären Aminosäurepool bestimmt. Für das extrazelluläre Aminosäurepool wird die spezifische Radioaktivität des Leucins direkt im Serum gemessen. Die Ermittlung der spezifischen Radioaktivität des Leucins im intrazellulären Aminosäurepool ist etwas schwieriger. Hier muß zunächst von der Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins im Muskelrohextrakt (siehe 2.1.3.) ausgegangen werden, in welchem anteilig Leucin aus dem intrazellulären und dem extrazellulären Aminosäurepool enthalten ist. Doch mit der Kenntnis einiger muskelspezifischer Parameter läßt sich aus den genannten Werten die spezifische Radioaktivität des Leucins im intrazellulären Aminosäurepool berechnen.

Nach eigenen Messungen ist die Leucinkonzentration im Serum 0,135 $\pm$ 0,017 mM. Bei einem Wassergehalt von 94 % im Serum (KIPNIS et al., 1959) ist somit die Leucinkonzentration im Serumwasser 0,144 mM (= C_{ex}).

Im Muskelrohextrakt wurde eine Leucinkonzentration von 0,041 $\pm$ 0,005 mM gemessen. Unter Berücksichtigung eines Verdünnungsfaktors von 4,25 bei der Herstellung des Rohextraktes (siehe 2.1.3.) und einem Wassergehalt des Muskels von 76 % (Gastrocnemius der Ratte, KIPNIS et al., 1959) wird eine Leucinkonzentration von 0,221 mM (= C_g) im Gewebewasser des Muskels errechnet. Mit Glucose Verteilungsexperimenten wurde gezeigt, daß von den 76 g Gewebewasser aus 100 g Muskulatur (Gastrocnemius der Ratte) 79,6 % intrazellulären (= V_i) und 20,4 % extrazellulären (= V_{ex}) Ursprungs sind (KIPNIS et al., 1959).

Mit diesen Angaben läßt sich eine intrazelluläre Leucinkonzentration von 0,247 mM (= C_i) nach folgender Formel berechnen:

$$C_i = \frac{C_g \cdot V_t - C_{ex} \cdot V_{ex}}{V_i}$$

Die Ermittlung der spezifischen Radioaktivität des Leucins

im intrazellulären Aminosäurepool kann nun mit folgender allgemein gültigen Formel ermittelt werden:

$$F_i^* = \frac{C_g \cdot F_g^* \cdot V_t - C_{ex} \cdot F_{ex}^* \cdot V_{ex}}{C_i \cdot V_i}$$

Auf unsere Parameter bezogen ergibt sich folgende vereinfachte Beziehung:

$$F_i^* = \frac{0,226 \cdot F_g^* - 0,0313 \cdot F_{ex}^*}{0,1966}$$

Die in der Tabelle 8 aufgeführten Werte für die spezifische Radioaktivität des Leucins im intrazellulären und extrazellulären Aminosäurepool werden in der Abbildung 20 in einem karthesischen und einem halblogarithmischen Koordinatensystem gegen die Zeit aufgetragen. Diese Werte besit-

TAGE NACH PULSMARKIERUNG	SPEZIFISCHE RADIOAKTIVITÄT, dpm/µMol Leucin AMINOSÄUREPOOL	
	INTRACELLULÄR	EXTRACELLULÄR
0,5	28,31	39,16
1	---	36,41
2	---	30,69
3	19,24	24,71
6	12,73	12,91
7	---	10,54
8	9,24	8,41
10	6,22	5,81
15	2,50	1,91

Tab. 8: Spezifische Radioaktivitäten des freien Leucins im intrazellulären und extrazellulären Aminosäurepool.

Diese Werte wurden errechnet aus den experimentellen Daten der spezifischen Radioaktivität des Leucins im Serum und Muskelrohextrakt.

zen in beiden Kompartimenten sehr ähnliche Werte. Die Kur-

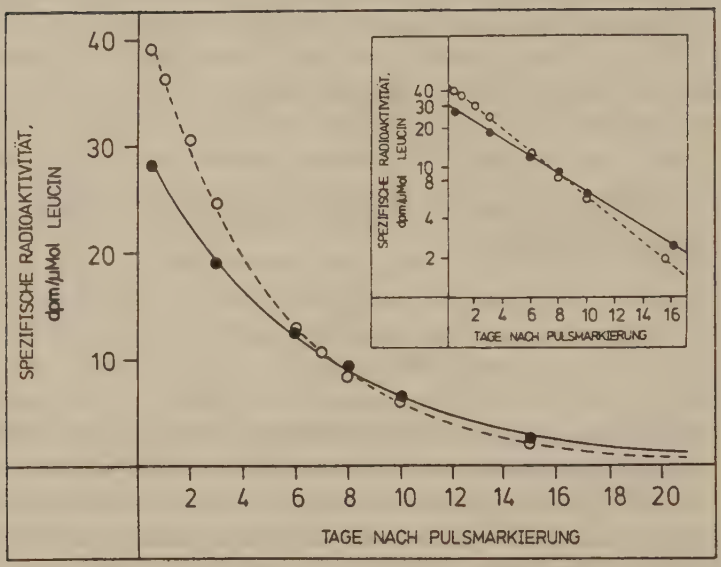


Abb. 20: Spezifische Radioaktivität des freien Leucins im intrazellulären und extrazellulären Aminosäurepool der Skelettmuskulatur 0,5- 15 Tage nach Gabe eines Pulses von ^{3}H- Leucin.

Die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Leucins im extrazellulären Aminosäurepool erfolgte durch Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins im Serum, während die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität des Leucins im intrazellulären Aminosäurepool unter Berücksichtigung muskelspezifischer Parameter aus der spezifischen Radioaktivität des Leucins im Serum und Rohextrakt errechnet wurde.
Die Punkte stellen die experimentellen (bzw. errechneten) Werte dar. Die eingezeichneten Kurven wurden nach dem Computerprogramm PROGRAMM II (siehe 3.2.) berechnet.
geschlossene Punkte: intrazelluläres Pool
offene Punkte : extrazelluläres Pool

ven fallen im untersuchten Zeitraum (0,5- 15 Tage nach Pulsmarkierung) exponentiell ab. Der aufsteigende Teil der Kurven konnte nicht gemessen werden, da die Maxima der spezifischen Radioaktivität sowohl im Serum (nach ca. 10 Sekunden) als auch im intrazellulären Raum (nach wenigen

Minuten) nach sehr kurzer Zeit erreicht werden (ZAK et al., 1979). Die F_e^*- Kurve verläuft etwas steiler als die F_i^*-Kurve. Da anfangs die spezifische Radioaktivität des Leucins im extrazellulären Aminosäurepool etwas höher ist als diese des intrazellulären Aminosäurepools, überkreuzen sich beide Kurven ca. 7 Tage nach Pulsmarkierung.
Aus den Steigungen der F^*- Kurven - -0,21 $Tage^{-1}$ für das extrazelluläre und -0,17 $Tage^{-1}$ für das extrazelluläre Aminosäurepool - lassen sich die Halbwertszeiten dieser Aminosäure in den beiden Kompartimenten nach der Formel $t_{1/2} = \ln 2 / m$ berechnen. Die Halbwertszeit für das Leucin im intrazellulären Aminosäurepool beträgt 4,1 Tage, im extrazellulären Aminosäurepool beträgt sie 3,3 Tage.

4.2.3. Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase

Zur Bestimmung des Turnovers der einzelnen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase muß in diesen nach präparativer Isolierung in homogener Form der radioaktive Einbau von ^3H- Leucin gemessen werden.
In diesen Polypeptiden erfolgt die Bestimmung der spezifischen Radioaktivität über einen Zeitraum von 21 Tagen in 12 Pulsmarkierungsexperimenten. Nach der Berechnung der spezifischen Radioaktivität des Proteins (dpm/mg) erfolgt die Umrechnung auf die spezifische Radioaktivität des Leucins im Protein (normalisierte spezifische Radioaktivität, dpm / µMol Leucin). Diesen Berechnungen werden folgende Leucinkonzentrationen in den einzelnen Polypeptiden zugrunde gelegt:

α : 0,99 µMol/mg (siehe Tabelle 2)
β : 0,98 µMol/mg (siehe Tabelle 2)
γ : 0,81 µMol/mg (siehe Tabelle 2)
δ : 0,53 µMol/mg (GRAND et al., 1981)

Die ermittelten Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase 0,5 bis 21 Tage nach Gabe des Pulses werden in der Tabelle 9 wiedergegeben.

TAGE NACH PULSMARKIERUNG	SPEZIFISCHE RADIOAKTIVITÄT, dpm/µMol Leucin UNTEREINHEIT DER PHOSPHORYLASE KINASE			
	α	β	γ	δ
0,5	7,61	6,88	7,61	5,74
1	16,84	15,62	17,54	13,07
2	15,83	15,19	17,06	10,62
3	16,81	16,68	19,10	8,08
4	17,21	15,60	17,99	7,66
5	16,58	16,17	18,03	----
6	14,27	13,29	15,39	4,92
7	13,23	12,91	13,72	5,44
8	13,50	12,72	13,88	5,88
10	13,21	11,52	12,22	5,19
15	8,04	8,10	8,24	2,36
21	5,63	5,76	5,10	1,56

Tab. 9: Spezifische Radioaktivitäten des Leucins in den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase 0,5- 21 Tage nach Gabe des Pulses.

Trägt man die spezifischen Radioaktivitäten des Leucins in den Untereinheiten in einem Koordinatensystem gegen die Zeit auf, so ergibt sich für die P*- Kurven der drei Untereinheiten α, β und γ ein sehr ähnlicher, fast paralleler Kurvenverlauf (siehe Abbildung 21): einem scheinbar linearen Anstieg bis zum 1. Tag folgt ein Plateau bis zum 5. Tag nach Pulsmarkierung. In diesem Bereich liegen die Maxima der einzelnen Kurven, welche aber aus den Meßpunkten nicht eindeutig bestimmbar sind. Vom 5. Tag an fallen die 3 Kurven wieder ab. Die P*- Kurve der δ- Untereinheit steigt ebenfalls an bis zum 1. Tag nach Pulsmarkierung, bildert von hier bis zum 2. Tag ein kurzes Plateau, um dann wieder stetig abzufallen.
Vergleicht man die absoluten Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den einzelnen Untereinheiten miteinander , so ergibt sich folgende Reihenfolge der Proteine absteigend von der höchsten spezifischen Radioaktivi-

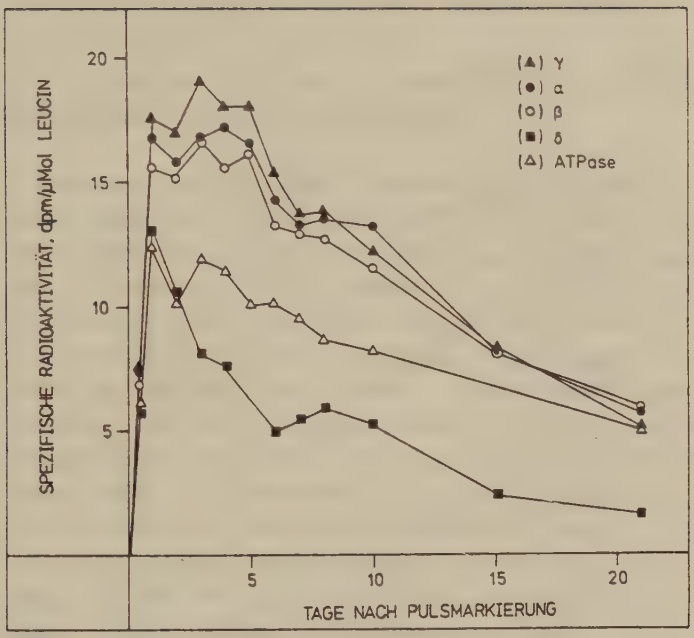


Abb. 21: Spezifische Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase und der Ca^{2+}-Transport ATPase 0,5- 21 Tage nach Gabe eines Pulses von ^{3}H- Leucin.

Die Proteine wurden aus der gemischten Muskulatur von Kaninchen isoliert. Die Umrechnung von cpm auf dpm erfolgte mit Hilfe eines internen Standards.

tät bei der γ- Untereinheit (Maximalwert: 19,10 dpm/µMol Leucin) über die Untereinheiten α, β bis zur δ - Untereinheit mit der niedrigsten spezifischen Radioaktivität (Maximalwert: 13,07 dpm/µMol Leucin). Erwähnenswert ist noch, daß die $P^{*\gamma}$- Kurve die $P^{*\alpha}$- Kurve am 9. Tag und die $P^{*\beta}$- Kurve am 17. Tag nach Pulsmarkierung schneidet. Um zu klären, ob die P^{*}- Kurven einen exponentiellen Abfall zeigen, werden die Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten halblogarithmisch gegen die Zeit aufgetragen. Aus der Abbildung 22 ist zu

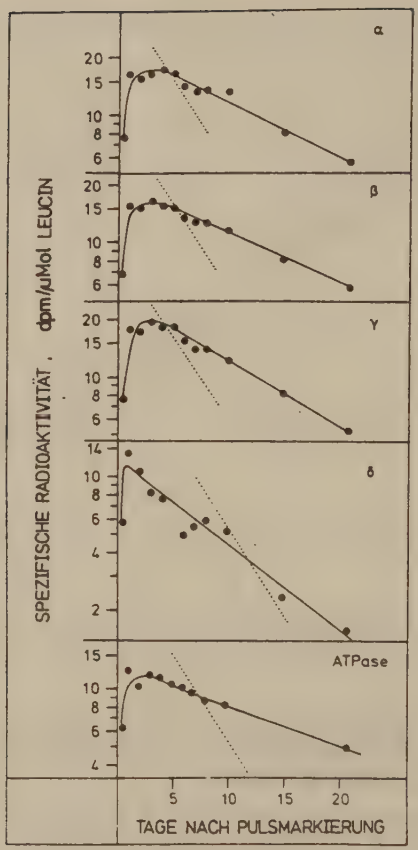


Abb. 22: Halblogarithmische Darstellung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase und der Ca^{2+}- Transport ATPase nach einmaliger Gabe von ^{3}H- Leucin.
Die gestrichelte Linie zeigt den Verlauf der F_e^*-*Kurve.*

ersehen, daß die Untereinheiten α, β und γ vom 4.- 5. Tag an einen exponentiell abfallenden Verlauf zeigen, der im Falle der δ- Untereinheit bereits am 2. Tag beginnt. Über eine lineare Regressionsanalyse zwischen den Tagen 3- 21 kann dieser Kurventeil halblogarithmisch durch eine Gerade angepaßt werden. Die Korrelationskoeffizienten liegen

zwischen 0,94 und 0,99.

4.2.4. Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in weiteren löslichen Muskelenzymen

Um die von uns angewandte Methode zur Turnovermessung zu überprüfen und um eine Relation der relativen Turnoverraten der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase zu anderen löslichen Muskelenzymen herstellen zu können, wird auch eine Turnoverbestimmung der löslichen Muskelenzyme Phosphorylase b und GAPDH vorgenommen, die bereits in der Literatur beschrieben worden sind (SIMPSON und VELICK, 1954; HEIMBERG und VELICK, 1954). Außerdem werden noch Turnoveruntersuchungen an einem weiteren löslichen Muskelenzym der Glycogenolyse vorgenommen, welches auch Substrat der Phosphorylase Kinase ist, der Glycogensynthase.
Die Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins erfolgt in der Phosphorylase b über einen Zeitraum von 21 Tagen (12 Pulsmarkierungsexperimente) und in den Enzymen Glycogensynthase und GAPDH über einen Zeitraum von 10 Tagen (10 Pulsmarkierungsexperimente). Für die Berechnungen der spezifischen Radioaktivität des Leucins in diesen Proteinen werden folgende Leucinkonzentrationen zugrunde gelegt:

Phosphorylase b : 0,81 µMol/mg (TITANI et al., 1977)
Glycogensynthase : 0,73 µMol/mg (NIMMO et al., 1976)
GAPDH : 0,50 µMol/mg (HARRIS et al., 1965)

Die ermittelten Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den 3 löslichen Muskelenzymen nach Pulsmarkierung sind aus der Tabelle 10 zu ersehen. Sie zeigen für die drei untersuchten Proteine eine sehr ähnliche Tendenz, die sich nur in der zeitlichen Lage des Maximums und in den absoluten Größen der spezifischen Radioaktivität unterscheidet. Bei den Enzymen Phosphorylase b und Glycogensynthase ist die Höhe der spezifischen Radioaktivität bis zum maximalen Wert fast gleich, wobei die Werte der Glycogensynthase im allgemeinen unwesentlich über denen der Phosphorylase b liegen. In beiden Fällen wird 5 Tage nach Pulsmarkierung das Maximum der spezifischen Radioaktivität erreicht, wel-

TAGE NACH PULSMARKIERUNG	SPEZIFISCHE RADIOAKTIVITÄT, dpm/µMol Leucin		
	PHOSPHORYLASE b	GLYCOGENSYNTHASE	GAPDH
0,5	5,65	7,03	1,02
1	11,21	12,82	2,81
2	8,61	8,40	3,27
3	10,84	9,17	3,63
4	9,50	11,62	2,36
5	11,76	11,68	3,63
6	8,77	10,28	3,78
7	8,14	9,71	3,93
8	9,59	9,51	3,67
10	9,18	8,49	2,74
15	7,42	----	----
21	6,89	----	----

Tab. 10: Spezifische Radioaktivität des Leucins in den Enzymen Phosphorylase b, Glycogensynthase und GAPDH nach Pulsmarkierung.

ches bei der Phosphorylase b einen Wert von 11,76 dpm/µMol Leucin und bei der Glycogensynthase einen Wert von 11,68 dpm/µMol Leucin annimmt. Die Absolutbeträge der spezifischen Radioaktivität des Leucins in der GAPDH erreichen ca. nur ein Drittel der Werte in den beiden anderen Enzymen. Hier wird das Maximum der spezifischen Radioaktivität erst 7 Tage nach Pulsmarkierung erreicht (3,93 dpm/µMol Leucin). Mit Hilfe einer linearen Regressionsanalyse kann bei der Phosphorylase b zwischen den Tagen 5- 21 und bei der Glycogensynthase zwischen den Tagen 4- 10 der abfallende Kurventeil halblogarithmisch mit einer Geraden angepaßt werden. Die Korrelationskoeffizienten liegen bei 0,80 (Phosphorylase b) und 0,97 (Glycogensynthase).
Da bei der GAPDH die spezifischen Radioaktivitäten des Leucins erst 7 Tage nach Pulsmarkierung abfallen, und nur noch 2 weitere Werte von späteren Messungen zur Verfügung stehen, ist in diesem Fall eine lineare Regressionsanalyse nicht sinnvoll.

4.2.5. Messung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in Membranproteinen der Muskelzelle

Neben der Bestimmung des Turnovers eines löslichen, oligomeren Enzyms mit heterologen Untereinheiten soll auch nachgewiesen werden, ob es einen "Polypeptid- exchange" bei membrangebundenen Enzymen gibt. Außerdem soll untersucht werden, ob sich aus dem Verlauf der P^*- Kurven der Membranenzyme eine Korrelation zu den P^*- Kurven der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase herstellen läßt. Aus diesem Grund wird der Turnover der Ca^{2+}- Transport ATPase und des Calsequestrins, zwei Enzymen des sarkoplasmatischen Retikulums, gemessen.
Diese Untersuchung erfolgt in der Ca^{2+}- Transport ATPase über einen Zeitraum von 21 Tagen (11 Pulsmarkierungsexperimente) und bei dem Calsequestrin über 10 Tage (10 Pulsmarkierungsexperimente). Die Ca^{2+}- Transport ATPase wird aus sarkoplasmatischem Reticulum isoliert, während das Calsequestrin zusammen mit der Glycogensynthase aus dem bei der Präparation der Phosphorylase Kinase anfallenden Sediment des Ultrazentrifugationslaufes (110000 x g) isoliert wird. Bei dieser Präparationsmethode kann das Calsequestrin in größeren Mengen gewonnen werden als aus den Vesikeln des sarkoplasmatischen Retikulum.
Die Berechnung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in diesen Enzymen wird mit folgenden Leucinkonzentrationen vorgenommen:

Ca^{2+}- Transport ATPase : 0,95 µMol/mg (MARTONOSI, 1971)
Calsequestrin : 0,76 µMol/mg (CAUDWELL et al., 1978)

Die Tabelle 11 zeigt die ermittelten spezifischen Radioaktivitäten des Leucins in den beiden membrangebundenen Muskelenzymen. Abgesehen von der Tatsache, daß die spezifischen Radioaktivitäten des Leucins in der Ca^{2+}- Transport ATPase in allen gemessenen Punkten über denen des Calsequestrins liegt, ist der Verlauf der Werte mit der Zeit sehr ähnlich. In beiden Proteinen steigt die spezifische Radioaktivität des Leucins bis zum 1. Tag nach Pulsmar-

TAGE NACH PULSMARKIERUNG	SPEZIFISCHE RADIOAKTIVITÄT, dpm/µMol Leucin	
	Ca^{2+}- TRANSPORT ATPase	CALSEQUESTRIN
0,5	6,15	4,32
1	12,41	8,38
2	10,12	5,59
3	11,90	6,23
4	11,47	9,02
5	10,07	8,72
6	10,17	8,29
7	9,53	7,11
8	8,63	7,72
10	8,28	7,41
21	4,90	----

Tab. 11: Spezifische Radioaktivität des Leucins in den Enzymen Ca^{2+}- Transport ATPase und Calsequestrin nach Pulsmarkierung.

kierung sehr steil an, flacht ab, um darauf bei der Ca^{2+}-Transport ATPase 3 Tage (11,90 dpm/µMol Leucin) und beim Calsequestrin 4 Tage nach Pulsmarkierung (9,02 dpm/µMol Leucin) ein Maximum zu durchlaufen. Anschließend fällt die spezifische Radioaktivität des Leucins exponentiell ab. Dieser Kurventeil kann durch eine lineare Regressionsanalyse halblogarithmisch mit einer Geraden angepaßt werden. Die Korrelationskoeffizienten liegen bei 0,82 (Ca^{2+}- Transport ATPase) und 0,99 (Calsequestrin).

4.2.6. Auswertung der Pulsmarkierungsexperimente

4.2.6.1. Ermittlung der relativen Turnoverraten aus den Pulsmarkierungsexperimenten nach 3 verschiedenen Methoden

Die relativen Turnoverraten υ_r werden aus den Parametern (P) berechnet, die aus den Pulsmarkierungsexperimenten ermittelt wurden. Die relative Turnoverrate der Ca^{2+}- Transport ATPase wird willkürlich = 1 gesetzt, und die relativen Turnoverraten der anderen Proteine werden auf diesen Wert bezogen. Aus diesem Grund wird der Parameter eines jeden untersuchten Proteins durch den entsprechenden Parameter der Ca^{2+}- Transport ATPase dividiert:

$$\upsilon_r = P_{(Protein)} : P_{(ATPase)}$$

1. Ermittlung der relativen Turnoverraten aus dem initialen Einbau:
Die spezifische Radioaktivität des Leucins steigt zwischen den Tagen 0- 1 nach Pulsmarkierung scheinbar linear an. Die Tabelle 12 enthält Mittelwerte für die initialen Einbauraten der Proteine 1 Tag nach Pulsmarkierung aus den spezifischen Radioaktivitäten 1 Tag und 0,5 Tage (umgerechnet auf einen Tag) nach Pulsmarkierung. Wegen der geringen Punktemenge sind die so ermittelten Daten für den initialen Einbau mit einem relativ großen Fehler behaftet. Signifikanzberechnungen nach dem Student T- Test sind ebenfalls der Tabelle 12 zu entnehmen (Signifikanzschranke bei $p<0,05$). Von den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase zeigen folgende Polypeptide einen signifikant unterschiedlichen initialen Einbau:
Geordnet nach der Höhe ihrer relativen Turnoverraten, beginnend mit dem Polypeptid mit der höchsten, absteigend zu dem mit der niedrigsten Rate, ergibt sich folgende Reihenfolge: γ , α > β> Glycogensynthase > Ca^{2+}- Transport ATPase, δ > Phosphorylase b > Calsequestrin > GAPDH.

2. Ermittlung der relativen Turnoverraten aus den maximalen Einbauraten ($dP/dt = 0$):
Bis auf die Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität

in der δ- Untereinheit weisen alle anderen Kurven im Bereich der Tage 1- 6 nach Pulsmarkierung ein breites Maximum auf. Da die Punkte dieses Kurvenbereiches nach einem Test auf "Nicht- Normalität" von DAVID et al. (1954) normal verteilt um einen Mittelwert (Kurvenmaximum) liegen, ist es erlaubt, einen Mittelwert zu bilden. Die Tabelle 13 enthält die Mittelwerte der spezifischen Radioaktivität für die maximalen Einbauraten und Signifikanzberechnungen nach dem Student T- Test. Die spezifischen Radioaktivitäten der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase sind zusätzlich nach dem einseitigen, nichtparametrischen Wilcoxon Test (WILCOXON, 1949) alle voneinander signifikant verschieden. Geordnet nach der Höhe ihrer relativen Turnoverraten, beginnend mit dem Polypeptid mit der höchsten, absteigend zu dem mit der niedrigsten Rate, ergibt sich folgende Reihenfolge: $\gamma > \alpha > \beta > \delta$, Ca^{2+}- Transport ATPase , Glycogensynthase , Phosphorylase b > Calsequestrin > GAPDH.

POLYPEPTID	INITIALE EINBAURATEN, dpm/µMol Leucin	p (Student T- Test)							
		β	γ	δ	ATPase	Gly.	Phosb	Cals.	GAP.
α	16,03 ± 0,36 (6)	0,05	0,60	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
β	14,69 ± 0,42 (6)		0,05	0,005	0,001	0,05	0,001	0,001	0,001
γ	16,38 ± 0,52 (6)			0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
δ	12,28 ± 0,36 (6)				0,90	0,05	0,02	0,001	0,001
Ca^{2+}-Transport ATPase	12,36 ± 0,02 (6)					0,005	0,001	0,001	0,001
Glycogensynthase	13,44 ± 0,28 (6)						0,001	0,001	0,001
Phosphorylase b	11,26 ± 0,02 (6)							0,001	0,001
Calsequestrin	8,51 ± 0,06 (6)								0,001
GAPDH	2,43 ± 0,17 (6)								

Tab. 12: Initiale Einbauraten.

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardfehler für die initialen Einbauraten 1 Tag nach Pulsmarkierung, die aus den spezifischen Radioaktivitäten 1 Tag und 0,5 Tage (umgerechnet auf 1 Tag) nach Pulsmarkierung berechnet worden sind.
Der Wert für p (Student T- Test) ist immer kleiner als der für ein Proteinpaar angegebene Wert.

POLYPEPTID	MAXIMALE EINBAURATEN, dpm/$_{\mu}$Mol Leucin	p (Student T- Test) β	γ	δ	ATPase	Gly.	Phosb	Cals.	GAP.
α	16,65 ± 0,23 (5)	0,05	0,01	0,02	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
β	15,85 ± 0,26 (5)		0,001	0,025	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
γ	17,94 ± 0,26 (5)			0,005	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
δ	11,85 ± 1,22 (2)				0,70	0,50	0,40	0,025	0,001
Ca^{2+}-Transport ATPase	11,19 ± 0,47 (5)					0,70	0,40	0,005	0,001
Glycogensynthase	10,74 ± 0,83 (5)						0,80	0,02	0,001
Phosphorylase b	10,38 ± 0,58 (5)							0,01	0,001
Calsequestrin	7,71 ± 0,58 (6)								0,001
GAPDH	3,14 ± 0,25 (5)								

Tab. 13: Maximale spezifische Radioaktivitäten.

Es handelt sich um Mittelwerte mit Standardfehler der spezifischen Radioaktivitäten der Proteine an den Tagen 1- 5 (δ- Untereinheit: Tage 1- 2). Die Bildung des Mittelwertes ist erlaubt, da die Werte normal verteilt um einen Mittelwert liegen (Test auf "Nicht- Normalität" nach DAVID et al., 1954). Der Wert für p (Student T-Test) ist immer kleiner als der für ein Proteinpaar angegebene Wert. Die maximalen spezifischen Radioaktivitäten der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase sind außerdem nach dem einseitigen, nichtparametrischen Wilcoxon Test signifikant verschieden.

3. Ermittlung der relativen Turnoverraten aus den apparenten Geschwindigkeitskonstanten des Abbaus:

Nach dem Durchlaufen des Maximums fallen die Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität in den Polypeptiden exponentiell ab (siehe Abbildung 22). Die Steigung dieser Geraden entspricht der apparenten Degradationskonstanten für eine Reaktion erster Ordnung. Die in der Tabelle 14 angegebenen apparenten Degradationskonstanten entstammen einer linearen Regressionsanalyse der spezifischen Radioaktivität im linearen Kurvenbereich. Signifikanzberechnungen nach dem Student T- Test sind der gleichen Tabelle zu entnehmen. Von den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase zeigen folgende Polypeptide eine signifikant verschiedene apparente Degradationskonstante: α - δ, β - γ, β - δ, γ - δ. Geordnet nach der Höhe ihrer aus den apparenten Degrada-

tionskonstanten berechneten relativen Turnoverraten, beginnend mit dem Polypeptid mit der höchsten, absteigend zu dem mit der niedrigsten Rate, ergibt sich folgende Reihenfolge: $\delta > \gamma$, α , β , Glycogensynthase , Ca^{2+}- Transport ATPase , Calsequestrin , Phosphorylase b.
Die apparenten Degradationskonstanten für Glycogensynthase und Calsequestrin wurden durch eine lineare Regressionsanalyse über 5 (Calsequestrin) bzw. 6 Tage (Glycogensynthase) ermittelt. Bei den übrigen Proteinen betrug dieser Zeitraum 19 Tage. Im Falle der GAPDH wurde keine lineare Regressionsanalyse durchgeführt, da das Maximum der spezifischen Radioaktivität erst an den Tagen 8- 10 nach Pulsmarkierung erreicht wird und keine weiteren Meßpunkte zu späteren Zeitpunkten vorliegen.

POLYPEPTID	k_d', $Tage^{-1}$	$t_{1/2}$, app. Tage	p (Student T- Test)						
			β	γ	δ	ATPase	Gly.	Phosb	Cals.
α	0,064 ± 0,004 (9)	10,9	0,50	0,10	0,005	0,01	0,40	0,001	0,10
β	0,060 ± 0,003 (9)	11,6		0,01	0,005	0,02	0,60	0,001	0,10
γ	0,074 ± 0,003 (9)	9,4			0,02	0,001	0,025	0,001	0,02
δ	0,099 ± 0,009 (9)	7,0				0,001	0,005	0,001	0,005
Ca^{2+}- Transport ATPase	0,049 ± 0,002 (8)	14,7					0,40	0,001	0,40
Glycogensynthase	0,056 ± 0,006 (5)	12,4						0,005	0,20
Phosphorylase b	0,024 ± 0,004 (9)	28,6							0,40
Calsequestrin	0,036 ± 0,013 (6)	19,3							

Tab. 14: Apparente Geschwindigkeitskonstanten des Abbaus (k_d') und apparente Halbwertszeiten.

Die Werte stammen aus einer linearen Regressionsanalyse der spezifischen Radioaktivitäten zwischen Kurvenmaximum und Endpunkt einer jeden Kurve. Auch in der Tabelle enthalten sind die Standardfehler der apparenten Degradationskonstanten und die Signifikanzberechnungen nach dem Student T- Test. Der Wert für p ist immer kleiner als der für ein Proteinpaar angegebene Wert.

4.2.6.2. Vergleich der relativen Turnoverraten, die nach 3 verschiedenen Methoden aus den Pulsmarkierungsexperimenten ermittelt wurden

Ein Vergleich der ermittelten Turnoverraten aus den initialen und den maximalen Einbauraten zeigt eine gute Übereinstimmung in der Reihenfolge der nach der Höhe der Turnoverraten angeordneten Polypeptide. Die Ausnahme ist die δ- Untereinheit, die nach der Berechnung aus den maximalen Einbauraten an 4. Stelle, nach der Berechnung aus den initialen Einbauraten aber an 6. Stelle dieser Reihenfolge liegt. Die Reihenfolge der Höhe der relativen Turnoverraten innerhalb der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase aber bleibt gewahrt. Die absolute Größe der relativen Turnoverraten der einzelnen Proteine nach den 2 Bestimmungsmethoden variiert zwischen 0 und 20 % (siehe Tabelle 15).
Ein Vergleich mit den Turnoverraten aus den apparenten Geschwindigkeitskonstanten des Abbaus zeigt im Falle der δ- Untereinheit eine hervorstechende Abweichung. Während diese Untereinheit nach den beiden ersten Bestimmungsmethoden die niedrigste relative Turnoverrate der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase aufweist, besitzt sie nach Berechnung aus der apparenten Degradationskonstanten die höchste relative Turnoverrate. Abgesehen von den Polypeptiden Glycogensynthase und Calsequestrin, deren apparente Halbwertszeiten aus oben genannten Gründen fehlerhaft sein können, stimmt die nach der Höhe ihrer relativen Turnoverraten angeordnete Reihenfolge der übrigen untersuchten Polypeptide mit der nach den beiden zuerst genannten Bestimmungsmethoden gefundenen Reihenfolge überein.(siehe Tabelle 15).
Von besonderem Interesse ist die Klärung der Diskrepanz in der Höhe der relativen Turnoverrate der δ- Untereinheit. Zu diesem Zweck, aber auch zur nochmaligen Absicherung der anderen Werte, wird ein Doppelmarkierungsexperiment durchgeführt.

POLYPEPTID	INITIALE EINBAURATEN	MAXIMALE EINBAURATEN	APPARENTE HALBWERTSZEITEN
α	1,30	1,49	1,31
β	1,19	1,42	1,22
γ	1,33	1,60	1,51
δ	0,99	1,06	2,02
Ca^{2+}- Transport ATPase	1,00	1,00	1,00
Glycogensynthase	1,09	0,96	1,14
Phosphorylase b	0,91	0,93	0,49
Calsequestrin	0,69	0,69	0,73
GAPDH	0,20	0,28	----

Tab. 15: Vergleich der relativen Turnoverraten, die nach 3 verschiedenen Methoden berechnet worden sind.

Die Werte der relativen Turnoverraten der einzelnen Proteine beziehen sich auf die relative Turnoverrate der Ca^{2+} - Transport ATPase, die willkürlich gleich 1 gesetzt worden ist. Weitere Informationen enthalten die Legenden der Tabellen 12- 14.

4.2.7. Doppelmarkierungsexperiment

Um die unter 4.2.6. beschriebenen widersprüchlichen Befunde über die relativen Turnoverraten bei der δ- Untereinheit der Phosphorylase Kinase zu klären, wird eine weitere unabhängige Bestimmungsmethode von relativen Turnoverraten vorgenommen: die Doppelisotopenmarkierung.

4.2.7.1. Versuchsdurchführung

Abgesehen von kleinen Änderungen verläuft dieses Experiment wie eines der bereits beschriebenen Pulsmarkierungsexperimente. Folgende Punkte sollen kurz den Verlauf dieses Experimentes skizzieren und die Unterschiede zu den Pulsmarkierungsexperimenten aufzeigen:

1. erster Puls mit 310 µCi ^{3}H- Leucin/kg
2. nach 20 Tagen zweiter Puls mit 35 µCi ^{14}C- Leucin/kg
3. Schlachtung der Kaninchen nach weiteren 24 Stunden
4. Wegen der hohen Isotopenkosten wird dieses Experiment

nur mit 4 Kaninchen (9 Kaninchen bei Pulsmarkierungsexperimenten) durchgeführt.
Aus der Skelettmuskulatur werden die Enzyme Phosphorylase Kinase, Phosphorylase b und Ca^{2+}- Transport ATPase isoliert. Wegen der geringen Fleischmenge wird auf die Präparation der anderen Enzyme verzichtet.
Nach Isolierung der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase wird der radioaktive Einbau in diese Polypeptide und in die Phosphorylase b und die Ca^{2+}- Transport ATPase durch Szintillationszählung nach 2.2.9.b bestimmt. Vor Ermittlung der Einbauquotienten $^{14}C/^{3}H$ werden die gemessenen cpm- Werte nach 4.1.1. korrigiert. Jede Probe wird viermal für 1 Minute gezählt, um einen Mittelwert mit Standardabweichung bilden zu können. Um eine Abhängigkeit des Einbauquotienten von der eingesetzten Proteinkonzentration auszuschließen, wird jedes Polypeptid bei einfacher und doppelter Proteinkonzentration gemessen. Der endgültige $^{14}C/^{3}H$- Einbauquotient wird schließlich als Mittelwert mit Standardabweichung der 4 Messungen mit einfacher und der 4 Messungen mit doppelter Proteinkonzentration angegeben (siehe Tabelle 16).
Eine Anordnung der Polypeptide nach der Größe der $^{14}C/^{3}H$-Einbauquotienten beginnend mit dem höchsten Quotienten absteigend zu dem niedrigsten Quotienten ergibt folgende Reihenfolge: $\delta > \gamma > \alpha > \beta > Ca^{2+}$- Transport ATPase > Phosphorylase b. Nach dem Student T-Test sind alle Einbauquotienten voneinander signifikant verschieden ($p<0,001$).

4.2.7.2. Ermittlung der relativen Turnoverraten aus dem Doppelmarkierungsexperiment

Die relativen Turnoverraten der Polypeptide werden aus dem Doppelmarkierungsexperiment berechnet, indem der Quotient der spezifischen Radioaktivität ^{14}C- Leucin / ^{3}H- Leucin eines jeden Polypeptids durch diesen Quotienten der Ca^{2+}-Transport ATPase dividiert wird. Die so gewonnenen relativen Turnoverraten enthält die Tabelle 17. Absteigend von dem Polypeptid mit der höchsten relativen Turnoverrate zu dem Polypeptid mit der niedrigsten relativen Turnoverrate

UNTEREINHEIT	PROTEIN, mg	^{3}H- LEUCIN, cpm	^{14}C- LEUCIN, cpm	^{14}C- LEUCIN / ^{3}H- LEUCIN
α	0,42	280,3 ± 10,0 (4)	54,8 ± 2,7 (4)	0,205 ± 0,011 (8)
	0,84	534,3 ± 4,8 (4)	114,9 ± 3,4 (4)	
β	0,31	303,0 ± 4,3 (4)	50,3 ± 2,5 (4)	0,175 ± 0,011 (8)
	0,62	582,3 ± 6,2 (4)	106,7 ± 4,6 (4)	
γ	0,48	288,5 ± 5,7 (4)	70,5 ± 4,0 (4)	0,248 ± 0,011 (8)
	0,96	546,7 ± 7,9 (4)	137,7 ± 3,8 (4)	
δ	0,94	100,5 ± 1,9 (4)	40,7 ± 3,8 (4)	0,391 ± 0,029 (8)
	1,88	203,7 ± 2,9 (4)	76,7 ± 5,3 (4)	
ATPase	0,31	339,5 ± 3,2 (4)	48,8 ± 3,2 (4)	0,149 ± 0,008 (8)
	0,62	651,3 ± 7,0 (4)	100,1 ± 7,0 (4)	
Phos. b	0,86	303,1 ± 4,8 (4)	31,7 ± 2,9 (4)	0,104 ± 0,007 (8)
	1,72	556,2 ± 8,9 (4)	57,4 ± 5,2 (4)	

Tab. 16: Auswertung des Doppelmarkierungsexperimentes.
Der radioaktive Einbau (^{3}H- Leu und ^{14}C- Leu) in die Polypeptide wird jeweils für 2 unterschiedliche Proteinkonzentrationen bestimmt (siehe 2.2.9.b). Jede Probe wird viermal für 1 Minute gezählt und und anschließend Mittelwert und Standardabweichung berechnet.
Der $^{3}H/^{14}C$- Einbauquotient wird aus den 8 Messungen (viermal einfache und viermal doppelte Proteinkonzentration) als Mittelwert mit Standardabweichung berechnet.
Nach dem Student T- Test sind alle Einbauquotienten voneinander signifikant verschieden ($p<0,001$).

ergibt sich folgende Reihenfolge: δ > γ > α ≥ β > Ca^{2+}-Transport ATPase > Phosphorylase b.

POLYPEPTID	DOPPELMARKIERUNGS-EXPERIMENT
α	1,38
β	1,17
γ	1 66
δ	2,62
Ca^{2+}- Transport ATPase	1,00
Phosphorylase b	0,70

Tab. 17: Ermittlung der relativen Turnoverraten aus dem Doppelmarkierungsexperiment.
Die relativen Turnoverraten wurden aus den $^{14}C/^{3}H$-Einbauquotienten der Tabelle 16 berechnet. Alle Werte beziehen sich auf die relative Turnoverrate der Ca^{2+}- Transport ATPase, die willkürlich = 1 gesetzt worden ist.

4.2.8. Vergleich der relativen Turnoverraten, die aus den Pulsmarkierungsexperimenten ermittelt wurden, mit denen aus dem Doppelmarkierungsexperiment

Die auf 4 verschiedene Arten berechneten relativen Turnoverraten der untersuchten Proteine sind in den Tabellen 15 und 17 aufgeführt. Abgesehen von der δ- Untereinheit ergibt sich bei allen 4 Bestimmungsmethoden eine fast identische Reihenfolge bei der Anordnung der Polypeptide nach der Höhe ihrer Turnoverraten.
Die δ- Untereinheit erhält die niedrigste relative Turnoverrate der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase bei der Berechnung nach den Bestimmungsmethoden, in welche die absolute Größe der spezifischen Radioaktivität eingeht. Die höchste relative Turnoverrate aller untersuchten Proteine dagegen wird für die δ- Untereinheit aus Berechnungsmethoden gewonnen, in welche nur die Veränderung der spezifischen Radioaktivität pro Zeit eingeht. Dieser vermeintliche Widerspruch kann durch die Annahme erklärt werden, daß die δ-Untereinheit aus einem anderen Präcursorpool synthetisiert wird als die anderen untersuchten Proteine. Da diese Ver-

mutung noch durch andere Indizien gestützt wird, sind die aus den initialen und den maximalen Einbauraten errechneten relativen Turnoverraten für die δ- Untereinheit falsch. Damit läßt sich aus den Pulsmarkierungsexperimenten und dem Doppelmarkierungsexperiment folgende Reihenfolge der Proteine geordnet nach der Höhe ihres Turnovers aufstellen: $\delta > \gamma > \alpha > \beta > Ca^{2+}$- Transport ATPase > Glycogensynthase > Phosphorylase b > Calsequestrin > GAPDH.
Abgesehen von den apparenten Halbwertszeiten (siehe Tabelle 14), die wegen des "Recycling" des Leucins zu lang sind, konnten in dieser Arbeit bisher keine wirklichen Halbwertszeiten berechnet werden. Dies wird möglich durch das von ZILVERSMIT (1960) vorgeschlagene mathematische Modell des Turnovers.

4.2.9. Berechnung tatsächlicher Halbwertszeiten der Proteine durch nicht lineare Kurvenanpassung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Polypeptiden nach Pulsmarkierung

Unter Berücksichtigung des Recyclings des ^3H- Leucins mit Hilfe einer nicht linearen Kurvenanpassung an die experimentell ermittelten spezifischen Radioaktivitäten des Leucins in den Proteinen über den unter 3.1. beschriebenen mathematischen Ansatz die tatsächlichen Degradationskonstanten und damit die wirklichen Halbwertszeiten der Polypeptide ermittelt werden.
Diese Berechnungen werden für jedes Protein einmal unter der Annahme, daß das intrazelluläre Aminosäurepool und einmal unter der Annahme, daß das extrazelluläre Aminosäurepool das Präcursorpool ist, durchgeführt.

4.2.9.1. Anpassung der spezifischen Radioaktivitäten des Leucins im Präcursorpool als eine exponentielle Funktion der Zeit

In die Gleichung 8 (siehe 3.1.) zur Berechnung der Degra-

dationskonstanten eines Proteins nach ZILVERSMIT et al. (1943 und 1960) geht die spezifische Radioaktivität des Präcursorpools als Funktion der Zeit ein. Durch Anpassung der experimentell ermittelten Werte für die spezifische Radioaktivität des Leucins in den Aminosäurepools mit Hilfe einer Exponentialfunktion durch das Computerprogramm PROGRAMM II (siehe 2.3.2.) wird die benötigte Funktion ermittelt. Das Programm berücksichtigt nicht den aufsteigenden Teil der Kurve, da für ihn keine Meßpunkte vorliegen, und dieser Kurvenabschnitt gemessen an der gesamten Funktion vernachlässigt werden kann.
Folgende Zeitfunktionen wurden von dem Computer für die beiden Präcursorpools ermittelt (siehe Abbildung 20):
intrazelluläres Aminosäurepool

$$F_i^* = e^{(-0,1562u + 3,44)}$$

extrazelluläres Aminosäurepool

$$F_e^* = e^{(-0,2018u + 3,79)}.$$

4.2.9.2. Nicht lineare Anpassung der Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Proteinen

Die Anpassung wird mit Hilfe des Computerprogramms PROGRAMM III (siehe 2.3.3.) vorgenommen. Für diese Berechnungen werden die experimentellen Wertepaare (Tage nach Pulsmarkierung / spezifische Radioaktivität des Leucins) mit folgenden Gewichtungspunkten versehen:

a) 1 Gewichtungspunkt : der Tag 1
b) 3 Gewichtungspunkte: die Tage 0, 0,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10
c) 15 Gewichtungspunkte: die Tage 15, 21

Der Tag 1 wird untergewichtet, da er scheinbar in allen Verlaufskurven herausfällt. Da der hintere Kurventeil (Tage 11- 21) mit experimentellen Punkten unterrepräsentiert ist, werden die beiden Punkte dieses Kurventeils so stark gewichtet, daß schließlich der vordere (Tage 0- 10) und der hintere Kurventeil (Tage 11- 21) gleiches Gewicht bekommen.
Die Abbildung 23 zeigt die vom Computer unter den beschrie-

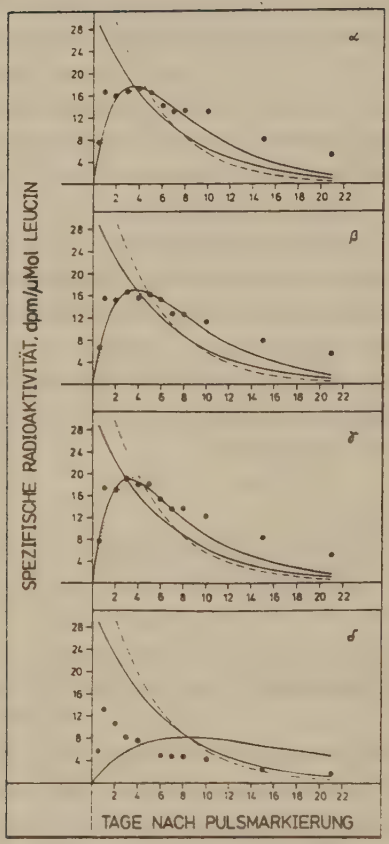


Abb. 23: Nicht lineare Kurvenanpassung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase nach Pulsmarkierung.

Die Berechnungen wurden mit den Computerprogrammen PROGRAMM II und PROGRAMM III (siehe 2.3.2. und 2.3.3.) durchgeführt. Die Punkte repräsentieren die experimentell ermittelten Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins.
Die beiden ausgezogenen Kurven stellen die F^*_i-Kurve (exponentiell) und die P^*_i- Kurve (komplex) dar. Entsprechend werden durch die gestrichelt gezeichneten Kurven die F^*_e- und P^*_e- Kurve wiedergegeben.

benen Bedingungen an die experimentell ermittelten Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den 4 Untereinheiten der Phosphorylase Kinase angepaßten P - Kurven. Jedes der vier Bilder der Abbildung 23 enthält 2 Kurvenpaare. Die durchgezogene, exponentiell abfallende Kurve beschreibt den Verlauf der spezifischen Radioaktivität des Leucins im intrazellulären Aminosäurepool 0,5- 21 Tage nach Pulsmarkierung (F_i^*- Kurve). Die komplexere, durchgezogene Kurve ist die vom Computer an die experimentell ermittelten Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Proteinen angepaßte Kurve (P_i^*- Kurve). Für diese Kurve wurde die F_i^*- Kurve als Präcursor zugrunde gelegt. Die entsprechenden Kurven für das extrazelluläre Aminosäurepool geben die beiden gestrichelt eingezeichneten Kurven wieder.

Abgesehen von dem Wert der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Proteinen am 1. Tag nach Pulsmarkierung, der in allen Fällen starke Abweichungen zeigt, sind die für die drei größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase berechneten P_i^*- Kurven zwischen den Tagen 0- 8 nach Pulsmarkierung gut an die experimentell ermittelten Werte angepaßt. Nach dem 8. Tag jedoch beträgt die Abweichung fast 200 %.

Die Güte der Anpassung der P_e^*- Kurven ist ähnlich. Die Steigungen dieser Kurven verlaufen etwas flacher als die der P_i^*- Kurven. Dadurch wird am Kurvenanfang (2.+ 3. Tag) eine etwas schlechtere Anpassung erreicht, wogegen die spezifische Radioaktivität des Leucins aber noch bis zum 10. Tag nach Pulsmarkierung gut angepaßt wird. Hinter dem 10. Tag liegen die experimentell ermittelten Werte wieder beträchtlich über den errechneten Werten, obwohl in diesem Bereich die P_e^*- Kurve über der P_i^*- Kurve liegt.

Bisher wurden nur die P^*- Kurven für die drei größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase betrachtet. Im Falle der ϵ- Untereinheit kann weder bei der P_i^*- noch bei der P_e^*- Kurve von einer Anpassung der experimentellen Daten gesprochen werden. Die errechneten Kurven verlaufen viel zu flach, so daß sie bis zum 4. Tag nach Pulsmarkierung weit

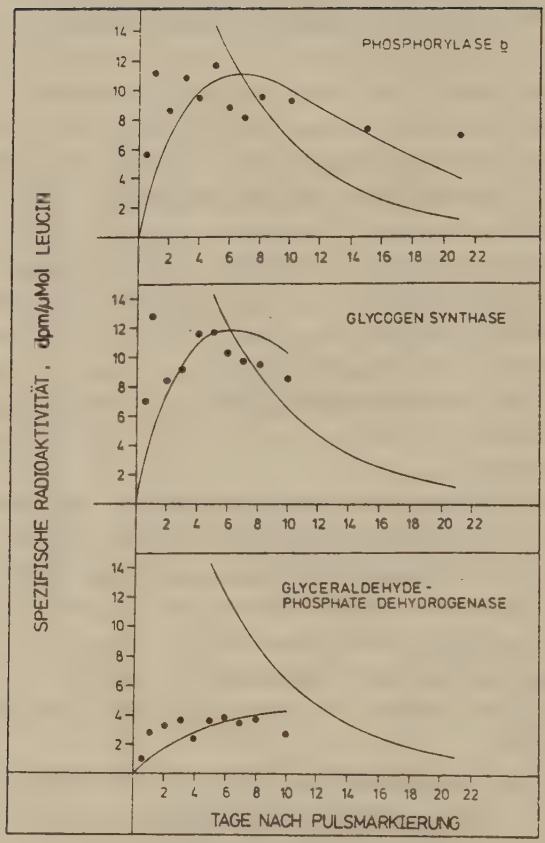


Abb. 24: Nicht lineare Kurvenanpassung der spezifischen Radioaktivität des Leucins in der Phosphorylase b, der Glycogensynthase und der GAPDH nach Pulsmarkierung.

Die Anpassungen wurden mit der F_i^*- Kurve als Präcursorpool vorgenommen. Für weitere Einzelheiten siehe die Legende zur Abbildung 23.

unter den experimentellen Werten liegt, um dann hinter diesem Zeitpunkt weit über diesen Werten zu liegen. Außerdem wird der Schnittpunkt der F^*- Kurve mit der $P^{*\delta}$- Kurve gemessen an den experimentellen Werten, um ca. 8 Tage zu spät erreicht.

Neben den P^*- Kurven der Untereinheiten der Phosphorylase

Kinase wurden auch die Verlaufskurven für die 3 anderen löslichen Muskelenzyme Phosphorylase b, Glycogensynthase und GAPDH exemplarisch mit dem intrazellulären Aminosäurepool als Präcursorpool berechnet (siehe Abbildung 24). Verglichen mit den Kurvenanpassungen bei den drei größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase sind diese Berechnungen nicht so gut gelungen, jedoch wesentlich besser als bei der δ- Untereinheit. Die etwas stärkere Streuung der experimentellen Punkte um die errechneten P_i^*- Kurven - besonders bei der Phosphorylase b und der Glycogensynthase - ist wahrscheinlich damit zu erklären, daß bei der Präparation dieser Enzyme nicht in jedem Fall eine so ausgezeichnete Reinheit erreicht werden konnte wie bei der Präparation der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase (siehe 4.1.3.). Die Erfordernisse dieser Arbeit (geringe ^3H- markierte Fleischmengen) machten die Isolierung dieser Enzyme aus einem Zwischenprodukt der Präparation der Phosphorylase Kinase notwendig (siehe 4.1.3.).

Im folgenden wird die Güte der Kurvenanpassungen durch die mittlere prozentuale und die mittlere absolute (vom Computer errechnet) Abweichung quantifiziert (siehe Tabelle 18). Die beiden Kriterien geben an, um wieviel sich im Mittel die errechneten Punkte der P^*- Kurven von den experimentellen Punkten unterscheiden. Nach diesen Werten ist die Anpassung der experimentell ermittelten spezifischen Radioaktivitäten des Leucins in den drei Untereinheiten α, β und γ der Phosphorylase Kinase sowohl mit den P_i^*- als auch mit den P_e^*- Kurven im Vergleich zu der Anpassung bei den anderen Proteinen am besten gelungen. Bei den größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase beträgt die mittlere prozentuale Abweichung durchschnittlich 17 %, während sie bei der Anpassung der anderen löslichen Muskelenzyme zwischen 20 und 25 % liegt. Eine mittlere prozentuale Abweichung von 70 % bei der δ- Untereinheit ist ein Zeichen für eine nicht gelungene Kurvenanpassung.

Die Entscheidung, welches Aminosäurepool eventuell als Präcursor bei der Synthese der untersuchten Proteine dient, ist an dieser Stelle nicht möglich. Jedoch ist die Güte der

POLYPEPTID	KONZENTRATION, $\frac{mg}{g\ Muskel}$	INTRAZELLULÄRER PRÄCURSOR					EXTRAZELLULÄRER PRÄCURSOR				
		k^x_{pi}, $Tage^{-1}$	k^x_{si}, $\frac{mg}{Tag \cdot g}$	$t_{1/2}$, Tage	PROZENTUALE ABWEICHUNG, %	ABSOLUTE ABWEICHUNG	k^x_{pe}, $Tage^{-1}$	k^x_{si}, $\frac{mg}{Tag \cdot g}$	$t_{1/2}$, Tage	PROZENTUALE ABWEICHUNG, %	ABSOLUTE ABWEICHUNG
α	0,13 (1)	0,448	0,06	1,6	17,7	2,3	0,236	0,03	2,9	18,8	2,5
β	0,12 (1)	0,401	0,05	1,7	16,5	2,1	0,213	0,02	3,3	18,5	2,4
γ	0,04 (1)	0,541	0,02	1,3	15,4	2,1	0,288	0,01	2,4	17,6	2,3
δ	0,02 (1)	0,086	0,001	8,1	70,2	3,9	0,059	0,001	11,7	71,1	3,8
ATPase	2,23 (4,5)	0,164	0,37	4,2	22,6	2,5	0,107	0,24	6,6	22,4	2,6
Phosphorylase b	3,18 (2)	0,147	0,47	4,7	22,0	2,3	0,100	0,32	6,9	21,4	2,3
Glycogensynthase	0,09 (3)	0,166	0,01	4,2	18,2	2,4	0,109	0,01	6,3	19,1	2,5
Calsequestrin	0,48 (4)	0,100	0,05	7,0	18,7	1,7	0,072	0,04	9,7	18,2	1,7
GAPDH	4,60 (2)	0,033	0,15	20,9	29,3	1,0	0,026	0,12	26,7	27,3	1,0

Tab. 18: Auswertung der Computeranpassung der Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den untersuchten Proteinen nach Pulsmarkierung.

Diese Berechnungen werden nebeneinander einmal mit dem intrazellulären und einmal mit dem extrazellulären Aminosäurepool als Präcursor durchgeführt. Die mittlere prozentuale und mittlere absolute Abweichung beschreiben die Güte der Kurvenanpassung in der Art, daß sie die mittlere Abweichung der experimentellen Werte von den errechneten Werten angeben.
Für "Steady state"- Bedingungen wurden die Turnoverkonstanten der Synthese (k_s - Werte) errechnet (siehe 3.1.). Die Konzentrationen der einzelnen Polypeptide pro 1 g Muskulatur (naß) wurden folgenden Literaturstellen entnommen:
(1): JENNISSEN et al., 1975) (2): PETTE, 1975)
(3): NIMMO et al., 1976) (4): HASSELBACH, 1979)
(5): PEACHEY, 1965)

Kurvenanpassung bei den drei größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase durch die P_i^*- Kurven unwesentlich besser als durch die P_e^*- Kurven, was möglicherweise auf das intrazelluläre Aminosäurepool als Präcursorpool hinweist. Neben den Gütekriterien für die Kurvenanpassungen enthält die Tabelle 18 auch die aus den P - Kurven errechneten Turnoverkonstanten (k_p) und Halbwertszeiten. Auffällig ist, daß die k_p- Werte der Proteine, welche aus den P_e^*- Kurven errechnet worden sind, um den Faktor 1,3- 1,8 unter den aus den entsprechenden P_i^*- Kurven ermittelten k_p- Werten liegen. Da bisher nicht entschieden werden konnte, welches Pool als Präcursorpool anzusehen ist, können mit k_{pi} und k_{pe} nur die Grenzen der tatsächlichen k_p- Werte berechnet werden.
Eine Anordnung der untersuchten Proteine nach der Größe der k_p- Werte ergibt folgende absteigende Reihenfolge:
γ > α > β >Glycogensynthase > Ca^{2+}- Transport ATPase > Phosphorylase b > Calsequestrin > δ > GAPDH.

4.2.9.3. Zerlegung der experimentell bestimmten Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Proteinen

Wie im letzten Kapitel beschrieben, ist es mit der bisher benutzten Methode nur möglich, innerhalb der ersten 8 Tage eine gute Kurvenanpassung zu erhalten. Zu späteren Zeitpunkten weichen die errechneten von den experimentell bestimmten Werten stark ab.
Eine naheliegende Möglichkeit zur Erklärung der geschilderten Abweichung wäre, daß eine Überlagerung mehrerer P^*- Kurven vorliegt. Deshalb wurde versucht, die Lage der experimentellen Punkte durch zwei verschiedene, sich überlagernde P^*- Kurven (zusammengesetzte Verlaufskurven) zu beschreiben. Zu diesem Zweck wurde mit dem Computer eine P^*- Kurvenschar für unterschiedliche k_p- Werte und dem intrazellulären Aminosäurepool als Präcursorpool berechnet. Anschließend wurden 2 geeignete Kurven dieser Schar addiert, so daß eine optimale Anpassung der experimentellen Werte im gesamten Untersuchungszeitraum erreicht wurde.

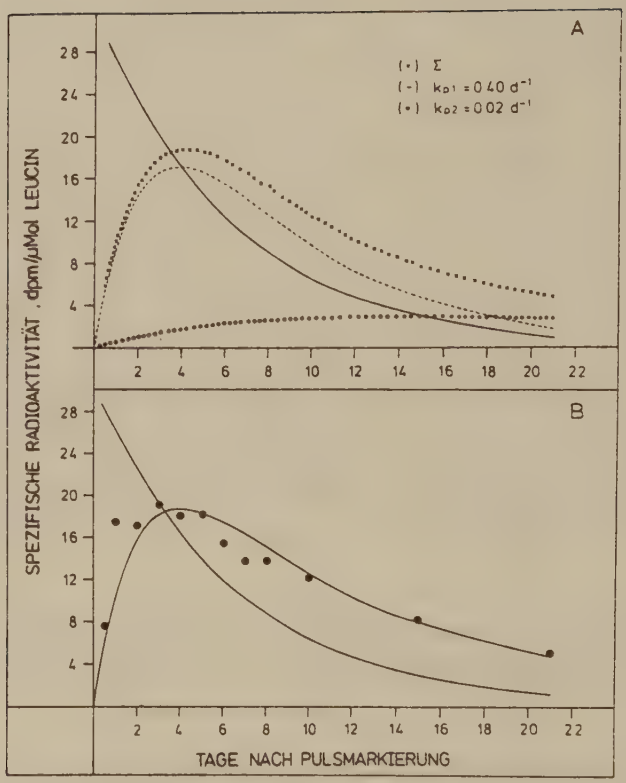


Abb. 25: Zerlegung einer experimentell ermittelten Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität im Protein nach Pulsmarkierung in 2 P^*- Kurven.

Aus einer Kurvenschar von P^* - Kurven werden die beiden P^*- Kurven addiert, die zusammen die beste Anpassung der experimentellen Werte über den gesamten Untersuchungszeitraum ergeben.

Die Abbildung 25 zeigt exemplarisch für die γ- Untereinheit, daß eine computerberechnete P_i^*- Kurve mit k_{pi} = 0,4 Tage^{-1} und eine P_i^*- Kurve mit k_{pi} = 0,02 Tage^{-1} diesen Anforderungen entspricht. Auf diese Weise konnte die mittlere Abweichung von den experimentellen Punkten von 15,4 % um den Faktor 1,8 auf 8,6 % verbessert werden (siehe Tabelle 19).
Eine nach dieser Art durchgeführte Kurvenanpassung für die

γ- Untereinheit mit 2 P_e^*- Kurven erbrachte eine um den Faktor 1,6 schlechtere Kurvenanpassung als mit den 2 P_i^*- Kurven. Aus diesem Grund werden die Anpassungen an die experimentellen Werte der α- und β- Untereinheit nach dieser Methode mit 2 P_i^*- Kurven vorgenommen. Ein Vergleich der Kurvenanpassungen mit der zusammengesetzten P_i^*- Kurve (siehe Abbildung 26) und mit der einfachen P_i^*- Kurve (siehe Abbildung 23) zeigt in allen drei Fällen eine bessere Anpassung über den gesamten Kurvenverlauf durch die zusammengesetzte P_i^*- Kurve. Die mittlere prozentuale Abweichung wird bei der Anpassung der experimentellen Werte der α- und γ- Untereinheit um den Faktor 1,8, bei der β- Untereinheit um den Faktor 1,3 verbessert (siehe Tabelle 18 und 19).

POLYPEPTID	k'^{x1}_{pi}, $Tage^{-1}$	k'^{x2}_{pi}, $Tage^{-1}$	$t^{(1)}_{1/2}$, Tage	$t^{(2)}_{1/2}$, Tage	PROZENTUALE ABWEICHUNG
α	0,35	0,02	2,0	34,7	9,8
β	0,30	0,02	2,3	34,7	12,4
γ	0,40	0,02	1,7	34,7	8,6
δ*	1,85	0,01	0,4	50,2	8,9

Tab. 19: Auswertung nach Zerlegung der Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase in 2 P_i^*- Kurven.

Bei der δ- Untereinheit wurde ein hypothetisches Präcursorpool zugrunde gelegt (siehe 4.2.9.4.).

Bedingt durch die zusammengesetzten Verlaufskurven erhält jedes Protein zwei Turnoverkonstanten und damit auch zwei Halbwertszeiten. Bei den drei größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase liegt die kleinere Halbwertszeit wie bei der Kurvenanpassung mit nur einer P_i^*- Kurve zwischen 1,7 und 2,3 Tagen, wogegen die längere Halbwertszeit, die für die betrachteten Untereinheiten scheinbar gleich ist,

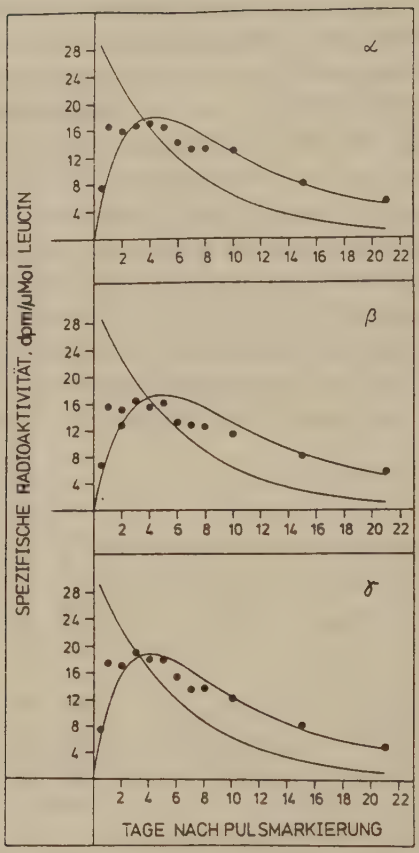


Abb. 26: Zerlegung der experimentell ermittelten Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten α, β und γ nach Pulsmarkierung in 2 P_i^*- Kurven.

Für die Methodik siehe die Legende zur Abbildung 25 und den Text.

bei 34,6 Tagen liegt (siehe Tabelle 19).

4.2.9.4. Verbesserung der Kurvenanpassung für die δ- Untereinheit

Eine Anpassung des Verlaufs der spezifischen Radioaktivität des Leucins in der δ- Untereinheit nach Pulsmarkierung ist bisher noch nicht gelungen. Wie die Abbildung 23 zeigt, kann weder das intrazelluläre noch das extrazelluläre Aminosäurepool das Präcursorpool für die δ- Untereinheit sein. Zur Verbesserung der Kurvenanpassung wird deshalb ein hypothetisches Präcursorpool für die δ- Untereinheit angenommen. Die Verlaufskurve dieses Präcursorpools ($F_i^{*\prime}$) schneidet die experimentell ermittelte Kurve der spezifischen Radioaktivität des Leucins in der δ- Untereinheit im Kurvenmaximum, welches aus der Lage der experimentellen Punkte festgelegt wird. Da der Unterschied der Steigung der F_i^*- und der F_e^*- Kurve relativ klein ist, wird für die $F_i^{*\prime}$- Kurve der gleiche Anstieg angenommen wie für die F_i^*- Kurve. Die Verlaufskurve dieses hypothetischen Pools wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$F_i^{*\prime} = e^{(-0{,}1562\ t\ +\ 2{,}60)} \quad .$$

Die Anpassung der experimentellen Punkte für die Verlaufskurve der δ- Untereinheit mit dem hypothetischen Präcursorpool reduziert den Fehler der Anpassung um den Faktor 3 (siehe Abbildung 27). Aus dieser $P_i^{*\delta}$ - Kurve läßt sich ein k'_{pi}- Wert von 1,81 $Tagen^{-1}$ und eine Halbwertszeit von 0,4 Tagen für die δ- Untereinheit errechnen.
Wie bei den anderen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase wird auch bei der δ- Untereinheit durch die $P_i^{*\prime\delta}$ - Kurve nur der vordere Teil der experimentellen Verlaufskurve (0- 7 Tage) gut angepaßt. Hinter dem 7. Tag beträgt die Abweichung bis zu 200 %.
Wie die Abbildung 27 zeigt, läßt sich auch die experimentelle Verlaufskurve für die δ- Untereinheit durch Addition von 2 $P_i^{*\prime}$- Kurven noch besser anpassen. Im Vergleich zu der Anpassung mit nur einer $P_i^{*\prime}$- Kurve verbessert sich die mittlere prozentuale Abweichung nochmals fast um das 3fache auf 9 % (siehe Tabelle 19).

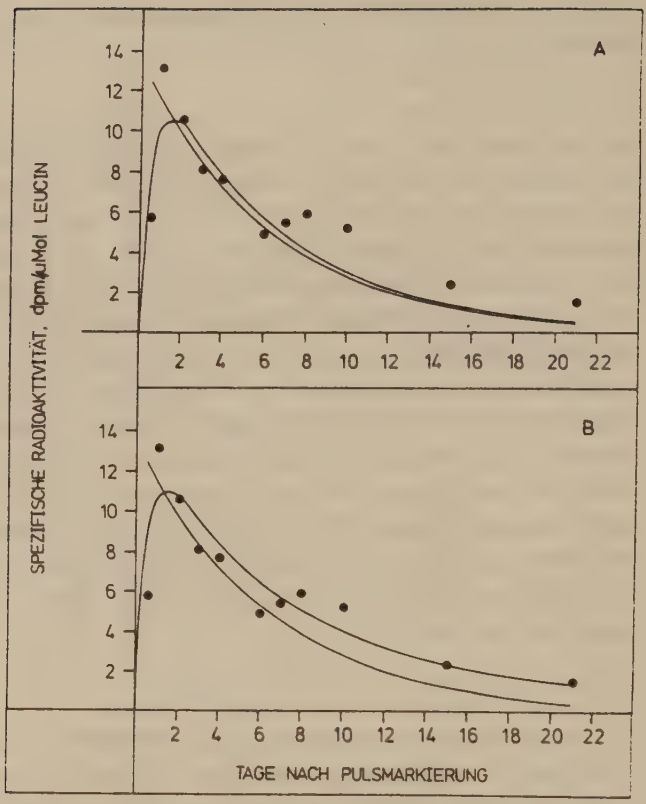


Abb. 27: Kurvenanpassung der experimentell ermittelten spezifischen Radioaktivitäten des Leucins in der σ- Untereinheit nach Pulsmarkierung.

A: Anpassung mit einer $P_i^{*\prime}$- Kurve
B: Anpassung durch Addition von zwei $P_i^{*\prime}$- Kurven

Nach dieser Methode ergeben sich auch für die σ- Untereinheit 2 k_p- Werte ($k_{pi}^{\prime\sigma 1}$ = 1,85 Tage^{-1} und $k_{pi}^{\prime\sigma 2}$ = 0,01 Tage^{-1}) und zwei verschiedene Halbwertszeiten ($t_{1/2}^{(1)}$ = 0,4 Tage und $t_{1/2}^{(2)}$ = 50,2 Tage).

4.2.9.5. Vergleich der Turnoverergebnisse, die durch Auswertung der Doppelmarkierung und den apparenten Degradationsraten gewonnen wurden mit den nach Computerauswertung erhaltenen Ergebnisse der gleichen experimentellen Werte

Nach diesen beiden verschiedenen Auswertungsmethoden ergibt sich für die Anordnung nach der Höhe der relativen Turnoverraten bei den untersuchten Proteinen die in der Tabelle 20 aufgeführte identische Reihenfolge.

REIHENFOLGE	app. DEGRADATINSKONSTANTE, DOPPELMARKIERUNG	COMPUTERAUSWERTUNG (errechnet aus den k_{pi}^{x}-Werten)
1	δ	δ^*
2	γ	γ
3	α	α
4	β	β
5	Ca^{2+}- Transport ATPase	Glycogensynthase, ATPase
6	Glycogensynthase	- - -
7	Phosphorylase b	Phosphorylase b
8	Calsequestrin	Calsequestrin
9	GAPDH	GAPDH

Tab. 20: Vergleich der relativen Turnoverraten, die durch Doppelmarkierung und aus den apparenten Degradationskonstanten ermittelt worden sind, mit denen aus der Computeranpassung.

* *Nur bei der Verwendung der F_i^{*}- Kurve als Präcursorpool für die δ- Untereinheit bei der Computeranpassung erhält diese die höchste Turnoverrate aller untersuchter Proteine.*

Die erwartete Abweichung bei der Berechnung der Halbwertszeiten aus den apparenten Degradationskonstanten und der Computerauswetung zeigt die Tabelle 21. Von den aus den P_i^{*}- Kurven errechneten Halbwertszeiten unterscheiden sich die längeren aus den apparenten Degradationskonstanten errechneten Halbwertszeiten um den Faktor 3- 7, von den

Halbwertszeiten aus den P_e^*- Kurven um den Faktor 2- 4. Die Halbwertszeit für die δ- Untereinheit wurde nach Kurvenanpassung mit dem hypothetischen Pool als Präcursor errechnet.

POLYPEPTID	$t_{1/2}$, Tage (app. Degradationskonstanten)	$t_{1/2}$, Tage (Computerauswertung)
δ	7,0	0,4*
γ	9,4	1,3 - 2,4
α	10,9	1,6 - 2,9
β	11,6	1,7 - 3,3
Ca^{2+}- Transport ATPase	14,7	4,2 - 6,5
Glycogensynthase	12,4	4,2 - 6,3
Phosphorylase b	28,6	4,7 - 6,9
Calsequestrin	19,3	7,0 - 9,7
GAPDH	----	20,9 -26,7

Tab. 21: Vergleich der Halbwertszeiten, welche aus den apparenten Degradationsraten ermittelt worden sind mit denen, die aus den P_i^*- und P_e^*- Kurven errechnet wurden.

* *Die Halbwertszeit der δ- Untereinheit (Computerauswertung wurde mit Hilfe des $F_i^{*\prime}$- Präcursorpools ermittelt.*

4.3. Immunbiochemische Untersuchungen

In dieser Arbeit werden Antikörper gegen isolierte Untereinheiten eines löslichen, oligomeren Muskelenzyms mit heterologen Untereinheiten und Antikörper gegen ein integrales Membranprotein hergestellt. Es soll untersucht werden, wie diese Antikörper gegen einzelne Untereinheiten zum einen die Aktivität und Spezifität des löslichen Enzyms Phosphorylase Kinase und zum anderen die Aktivität und Spezifität der membrangebundenen Ca^{2+}- Transport ATPase beeinflussen.

4.3.1. Herstellung monospezifischer Antikörper gegen die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase

Hemmende Antikörper gegen das Holoenzym der Phosphorylase Kinase wurden bereits früher erfolgreich hergestellt (DICKNEITE et al., 1978). Da es sich aber um ein Antikörpergemisch gegen die einzelnen Untereinheiten handelte, konnte es nur verwendet werden, um z.B. die Substratspezifität des Holoenzyms gegenüber verschiedenen Substraten zu untersuchen. Die Herstellung und Charakterisierung monospezifischer Antikörper gegen die isolierten Untereinheiten könnte vielleicht Aufschluß über die Funktion der einzelnen Untereinheiten im Enzymverband des Holoenzyms geben. Als Immunogen wurden die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase, deren Präparation aus dem Holoenzym in reiner - allerdings in denaturierter - Form in 4.1.1. beschrieben worden ist, verwendet.

4.3.1.1. Entwicklung des Titers hemmender und aktivierender Antikörper gegen die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase

Zur Antikörperherstellung werden die Schafe wie unter 2.1.15. beschrieben immunisiert, und aus dem abgenommenen Blut wird eine antikörperhaltige Fraktion nach 2.1.16. isoliert. Die Entwicklung von hemmenden und aktivierenden Antikörpern wird über den gesamten Immunisierungszeitraum in bestimmten

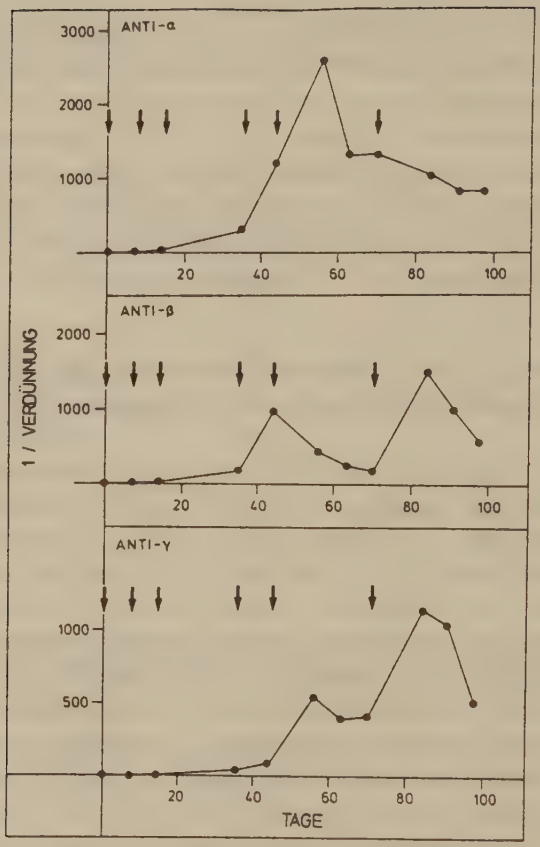


Abb. 28: Entwicklung des Antikörpertiters ("Hemmtiter") im Schaf gegen die Untereinheiten α, β und γ der Phosphorylase Kinase bei pH 8,2.

Die Immunisierung verläuft über einen Zeitraum von 99 Tagen. Die Zeitpunkte der Immunogeninjektion sind durch Pfeile gekennzeichnet. Um die Entstehung des Antikörpertiters zu verfolgen, werden an diesen Tagen geringe Mengen Blut entnommen. An den Tagen 57, 64, 85, 92 und 99 nach Erstimmunisierung werden je 500 ml Blut entnommen. Nach Aufarbeitung des antikörperhaltigen Serums nach 2.1.16. wird der Hemmtiter bestimmt. Als Antikörpertiter wird der Reziprokwert der Antikörperlösung angegeben, von der 1 ml bei pH 8,2 zu einer 50 %igen Hemmung von ca. 1 ug Phosphorylase Kinase führt.

Zeitabständen verfolgt. Die Zeitpunkte der Immunogengabe sind durch Pfeile gekennzeichnet. Neben der Entnahme größerer Blutmengen (400- 500 ml) an den unter2.1.15. aufgeführten Tagen, werden auch an den Tagen der Immunogeninjektion geringe Mengen Blut abgenommen, um die Entstehung des Antikörpers zu verfolgen.

Die Potenz hemmender Antikörper wird durch die Angabe eines Antikörpertiters quantifiziert. Als Antikörpertiter wird der Reziprokwert der Antikörperlösung angegeben, von der 1 ml bei pH 8,2 zu einer 50 %igen Hemmung von ca. 1 µg Phosphorylase Kinase führt.

Die Potenz aktivierender Antikörper wird durch die Angabe einer prozentualen Aktivierung von Phosphorylase Kinase bei pH 6,8 quantifiziert. Dazu wird jeweils ca. 1 µg Phosphorylase Kinase mit den verschiedenen Antikörperlösungen von den unterschiedlichen Zeitpunkten der Entnahme nach Erstimmunisierung versetzt. Die Antikörperlösungen sind alle gleich stark verdünnt.

Die Bildung von Antikörpern, deren hemmende Eigenschaft auf die Aktivität der Phosphorylase Kinase bei pH 8,2 gemessen wird, verläuft für die 4 Antigene zeitlich verschieden (siehe Abbildung 28). Während in allen Fällen die ersten hemmenden Antikörper 14 Tage nach Erstimmunisierung nachgewiesen werden können, erreichen die Antikörpertiter ihre Maximalwerte zu verschiedenen Zeitpunkten.

Der Titer von Anti α erreicht 56 Tage nach Erstimmunisierung seinen Maximalwert (ca. 2700), um darauf anfangs sehr steil, dann wieder langsamer abzufallen. Am letzten untersuchten Tag (97 Tage nach Erstimmunisierung) liegt der Titer noch bei 800.

Bei Anti β durchläuft der Titer 2 Maximalwerte. Das erste Maximum wird am 43. Tag (ca. 1000), das 2. Maximum am 80. Tag nach Erstimmunisierung erreicht (ca. 1500). Zwischen diesen Maxima geht der Titer am 70. Tag nach Erstimmunisierung auf ca. 100 zurück. Am letzten untersuchten Tag (97 Tage nach Erstimmunisierung) liegt die Höhe des Titers noch bei 500.

Auch bei Anti γ werden 2 Titermaxima durchlaufen, die aber

im Vergleich zu Anti β zeitlich verschoben sind. Das erste, niedrigere Maximum (ca. 550) wird 56 Tage nach Erstimmunisierung erreicht, während das 2. Maximum (ca. 1150) am 84. Tag durchlaufen wird. Die Titerhöhe zwischen diesen Maxima liegt unwesentlich unter der des ersten Maximums. Am 97. Tag nach Erstimmunisierung liegt der Antikörpertiter noch auf der Höhe des ersten Maximums.
Bei Anti δ wurden bisher nur die Antikörperlösungen der Tage 56 und 63 nach Erstimmunisierung untersucht. Die ermittelten Werte sind schlecht reproduzierbar und variieren scheinbar abhängig von der Enzympräparation (siehe Tabelle 22).

KINASE PRÄPARATION	% HEMMUNG ANTI-δ (56. Tag)	ANTI-δ (63. Tag)
I	4 %	12 %
II	25 %	39 %
III	1 %	9 %
IV	28 %	30 %
V	0 %	1 %

Tab. 22: Einfluß von Anti δ auf die Aktivität verschiedener Phosphorylase Kinase Präparationen bei pH 8,2.
100 % entspricht der Aktivität von 13 µg/ml Phosphorylase Kinase in Abwesenheit von Serum.
In allen Fällen wurden 1 ml Anti δ (1:10 verdünnt) zur vorgelegten Phosphorylase Kinase gegeben.

Der Einfluß der Antikörper auf die Aktivität der Phosphorylase in Abhängigkeit ihrer Entnahme nach Erstimmunisierung wird auch bei pH 6,8 untersucht. Während Anti α und Anti δ die Aktivität der Phosphorylase Kinase ähnlich wie bei pH 8,2 beschrieben hemmen, werden bei Anti β und Anti γ aktivierende Antikörper gefunden.
Bei einer Antikörperverdünnung von 1 : 100 hemmt Anti β die Aktivität der Phosphorylase Kinase vom 14. bis 44. Tag nach

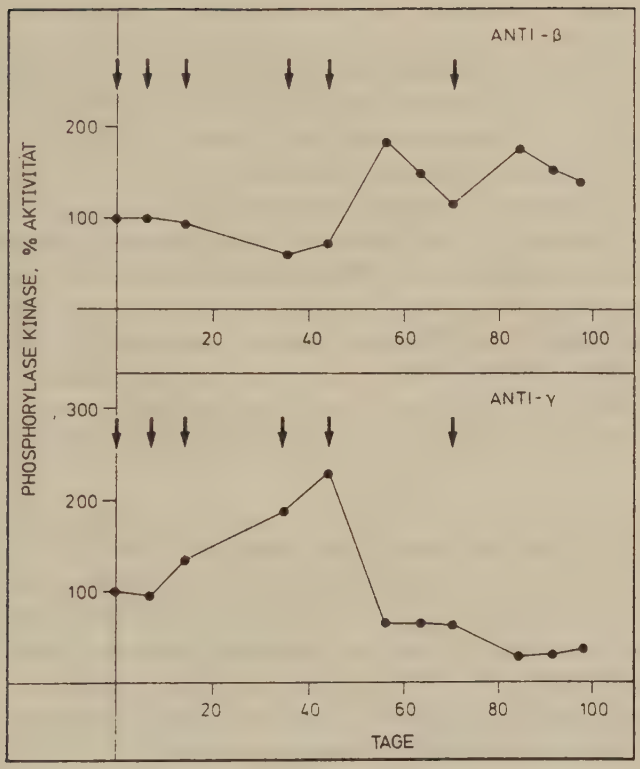


Abb. 29: Entwicklung von aktivierenden Antikörpern im Schaf gegen die Untereinheiten β und γ der Phosphorylase Kinase bei pH 6,8.

Anti β: Zu 0,99 ml Phosphorylase Kinase (ca. 10 µg) werden jeweils 10 µl der zu verschiedenen Zeitpunkten nach Immunisierung gewonnenen und nach 2.1.16. aufgearbeiteten Antikörperlösungen gegeben.
Anti γ: Zu 0,9 ml Phosphorylase Kinase (ca. 10 µg) werden jeweils 0,1 ml der verschiedenen Antikörperlösungen gegeben.
Die Aktivität der Phosphorylase Kinase wird bei pH 6,8 gemessen. Für weitere Angaben siehe Legende zur Abbildung 28.

Erstimmunisierung bis zu 20 %. Am 56. Tag ist eine 1,9fache Aktivierung der Enzymaktivität festzustellen, die an den Tagen 63 und 70 wieder abnimmt, am 84. Tag nach Erstimmunisierung aber wieder erreicht wird. Am letzten untersuchten Tag (Tag 97) ist die Aktivierung der Enzymaktivität noch

1,4fach. Das erste Maximum der Aktivierung fällt genau zwischen die beiden Hemmungsmaxima des Anti β bei pH 8,2, während das zweite Maximum der Aktivierung mit dem zweiten Maximum der Hemmung nahezu zusammenfällt.
Bei Anti γ wird nur 1 Maximum der Aktivierung durchlaufen. Dieser Antikörper, der 44 Tage nach Erstimmunisierung gewonnen wurde, aktiviert die Phosphorylase Kinase bei einer Verdünnung von 1 : 10 ca. 2,5 fach. Bei pH 8,2 wird mit diesem Antikörper eine geringe Hemmung festgestellt. Zu späteren Zeitpunkten ist keine Aktivierung durch Anti γ mehr festzustellen, vielmehr wird die Aktivität der Phosphorylase Kinase zu späteren Zeitpunkten bis zu 40 % gehemmt.
Aus diesen Versuchen wird deutlich, daß die Immunisierung für jedes Antigen verschieden verläuft. Die Maxima der Antikörpertiter werden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Erstimmunisierung erreicht und fallen trotz weiterer Boosterinjektionen manchmal völlig ab. Es zeigt sich außerdem, daß sich zeitabhängig während des Immunisierungsvorganges Antikörper gegen verschiedene Haptene mit verschiedener Wirkung auf die Aktivität des Holoenzyms bilden.

4.3.1.2. Einfluß der Antikörperkonzentration auf die Aktivität der Phosphorylase Kinase

Die Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase wird bei pH 8,2 durch alle 4 Antikörper gehemmt. Bei pH 6,8 wirken die Antikörper Anti α und Anti δ hemmend auf die Enzymaktivität, während Anti β und Anti γ aktivierend wirken. Entsprechend den unterschiedlichen Aktivitäten ist die Enzymkonzentration bei gleichem Substratumsatz bei pH 6,8 im Test ca. 20fach höher als bei der Messung bei pH 8,2.
Anti α hemmt die Aktivität der Phosphorylase Kinase konzentrationsabhängig bei beiden pH- Werten (siehe Abbildung 30). Bei hohen Antikörperkonzentrationen tritt in beiden Fällen eine Restaktivität der Phosphorylase Kinase von etwa 15- 20 % auf. Die Titrationskurven sind jedoch gegeneinander ver-

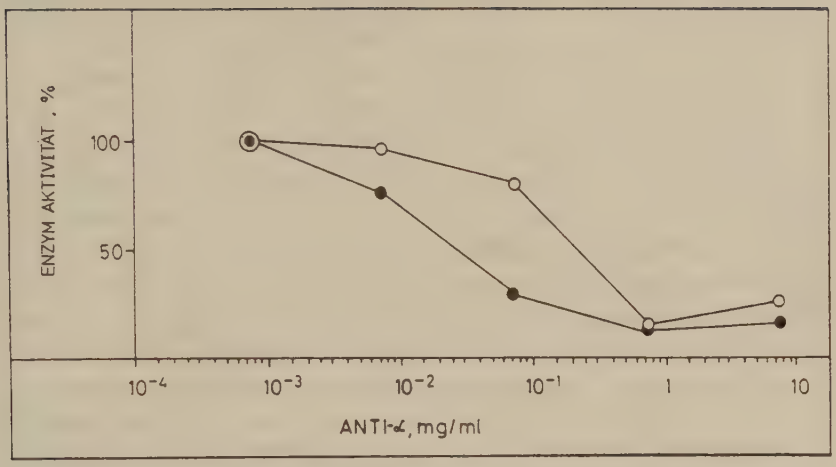


Abb. 31: Hemmung (Immunotitration) von Phosphorylase Kinase mit Anti α bei pH 6,8 und pH 8,2 im halblogarithmischen Maßstab.

Die spezifische Aktivität der Phosphorylase Kinase betrug bei pH 6,8 139 U/mg und bei pH 8,2 6300 U/mg. Die Ansätze von 1 ml enthielten Phosphorylase Kinase bei pH 6,8 in einer Konzentration von 13 µg/ml (Aktivität dieser Enzymmenge in Gegenwart einer - dem zugesetzten Anti α der Vergleichsprobe entsprechenden - Menge Kontrollserum = 100 % bei pH 6,8) und bei pH 8,2 in einer Konzentration von 0,65 µg/ml (Aktivität dieser Enzymmenge in Gegenwart einer - dem zugesetzten Anti α der Vergleichsprobe entsprechenden - Menge Kontrollserum = 100 % bei pH 8,2). Die in 1 ml Ansatz enthaltene Proteinmenge an Anti α ist auf der Abzisse angegeben. Das Kontrollserum hatte keinen Einfluß auf die Enzymaktivität.
(○) pH 6,8
(●) pH 8,2

schoben. Da trotz 20fach höherer Enzymmenge pro ml Ansatz nur eine ca. 7fach höhere Antikörpermenge für eine 50 %ige Hemmung des Enzyms bei pH 6,8 als bei pH 8,2 notwendig ist, läßt sich errechnen, daß bei pH 8,2 das Verhältnis von Antikörper zu Enzym für eine 50 %ige Hemmung ca. 3fach höher sein muß.

Anti β (57 Tage nach Erstimmunisierung) hemmt die Aktivi-

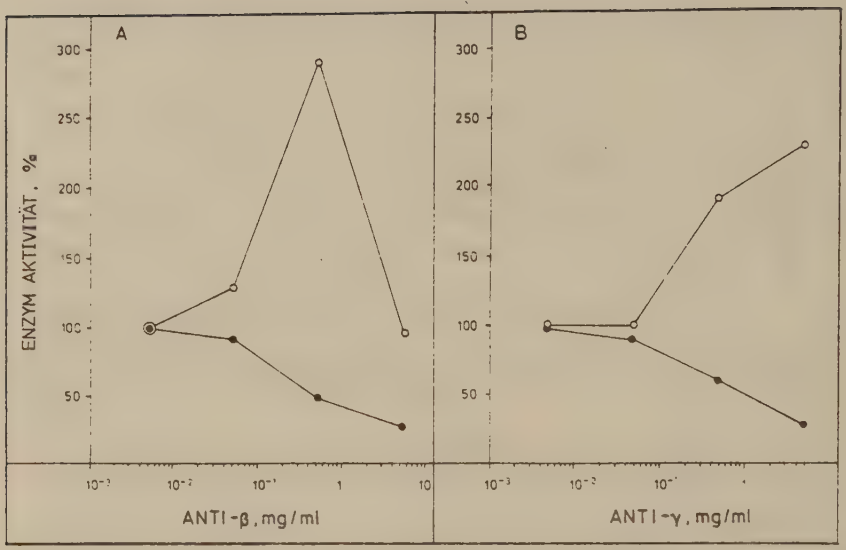


Abb. 32: Hemmung und Aktivierung (Immunotitration) von Phosphorylase Kinase mit Anti β bzw. Anti γ bei pH 6,8 und 8,2 im halblogarithmischen Maßstab.

Für weitere Angaben zur Methodik siehe Legende zur Abbildung 31.

(○) *pH 6,8*
(●) *pH 8,2*

tät der Phosphorylase Kinase konzentrationsabhängig bei pH 8,2 bis zu einer Restaktivität von ca. 25 % bei hoher Antikörperkonzentration (siehe Abbildung 32). Bei pH 6,8 durchläuft die Aktivitätskurve in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration ein Maximum, da das Enzym bei diesem pH-Wert maximal ca. 3fach aktiviert wird. Bis zu einer Antiserumkonzentration von ca. 0,5 mg/ml (d.h. 50 % Hemmung bei pH 8,2) ist die Aktivierung eine Funktion der Antikörpermenge; bei höheren Antiserumkonzentrationen überwiegt der hemmende Einfluß der Antikörper, so daß die Ausgangsaktivität wieder erreicht wird.

Anti γ (43 Tage nach Erstimmunisierung) verhält sich ähnlich wie Anti β (siehe Abbildung32). Bei pH 8,2 ist wieder

eine konzentrationsabhängige Hemmung der Phosphorylase Kinase zu beobachten. Für eine 50 %ige Hemmung des Enzyms wird eine Antikörperkonzentration von ca. 0,9 mg/ml benötigt. Bei hoher Antikörperkonzentration verbleibt eine Restaktivität von ca. 25 %. Eine Aktivierung der Enzymaktivität wird bei pH 6,8 beobachtet, die aber in diesem Fall kein Maximum durchläuft. Eine Antikörperkonzentration von 5 mg/ml aktiviert die Enzymaktivität etwa 2,5fach.
Anti δ läßt eine Messung seiner Hemmaktivität nur unter Schwierigkeiten zu, da das Präimmunserum bei Verdünnungen unter 1 : 5 (ca. 10 mg/ml) die Aktivität der Phosphorylase Kinase stark aktiviert, und die Stärke der Hemmung durch den Antikörper bei pH 8,2 abhängig ist von der Phosphorylase Kinase- Präparation (siehe Tabelle 22). Erste Experimente deuten aber auch bei Anti δ auf eine konzentrationsabhängige Hemmung der Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase hin, die aber im Vergleich zu den anderen drei Antikörpern wesentlich schwächer ist.
Wie bereits oben beschrieben wurde, aktivieren Anti β (vom 57. Tag nach Erstimmunisierung) und Anti γ (vom 43. Tag nach Erstimmunisierung) bei pH 6,8 die Enzymaktivität der Phosphorylase Kinase. Um diese Aktivierung als Ergebnis immunologischer Wechselwirkungen betrachten zu können, muß ausgeschlossen werden, daß sie nicht durch partielle Proteolyse durch Proteasen (siehe Einleitung) des Serums hervorgerufen wird. Um diese Frage zu klären, werden konstante Mengen Anti β bzw. Anti γ vorgelegt und mit steigenden Mengen Kaninchen- Anti- Schaf IgG (LKB) versetzt und für 20 Minuten inkubiert. Nachdem das Präzipitat, das sich gebildet hatte, abzentrifugiert worden ist, werden zu dem Überstand jeweils gleiche Mengen Phosphorylase Kinase gegeben, deren Aktivität nach 20 Minuten gemessen wird. Unter den gewählten Bedingungen kann die aktivierende Wirkung von Anti β um etwa 70 % und die aktivierende Wirkung von Anti γ bis auf 95 % heruntertitriert werden (siehe Abbildung 33).

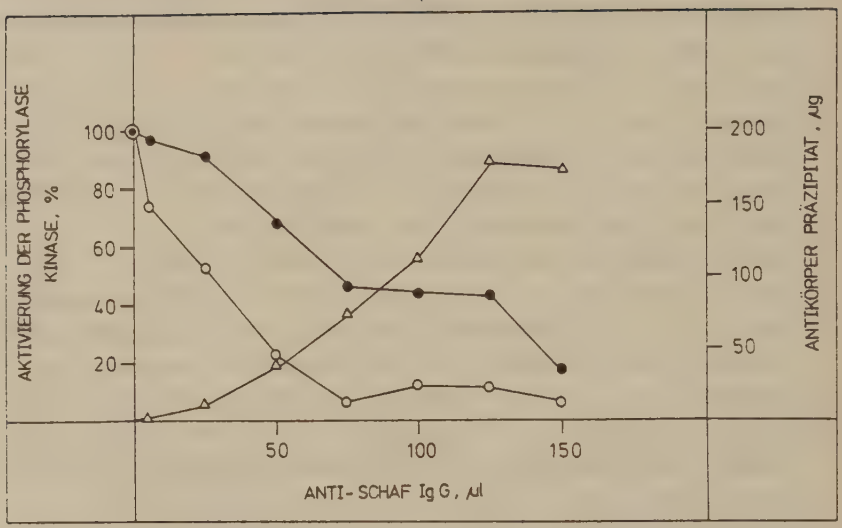


Abb. 33: Titration der Aktivierung von Phosphorylase Kinase durch Anti β bzw. Anti γ mit Kaninchen- Anti- Schaf IgG.

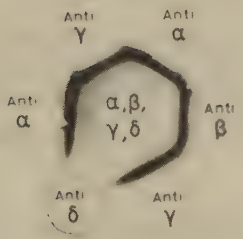
In 8 getrennten Ansätzen werden jeweils 10 µl Anti β (bzw. 100 µl Anti γ) vorgelegt. Es werden folgende Volumina Anti- Schaf IgG hinzugegeben: 0, 5, 25, 50, 75, 100, 125, 150 µl. Jeder Inkubationsansatz wird mit Phosphorylase Kinase- Verdünnungspuffer auf ein Endvolumen von 1 ml aufgefüllt (Anti β- Verdünnung 1 : 100, Anti γ- Verdünnung 1 : 10). Nach 20 Minuten Stehen auf Eis wird das Immunpräzipitat abzentrifugiert, und zum Überstand jeweils 10 µl Phosphorylase Kinase gegeben (ca. 1 µg). Die Aktivität des Enzyms wird nach 20 minütigem Stehen auf Eis im Auto- Analyzer bestimmt.

(△) *Proteinmenge des abzentrifugierten Immunpräzipitates Anti β - Anti- Schaf IgG*
(●) *Anti β*
(○) *Anti γ*

4.3.1.3. Immunpräzipitationsverhalten

Bei Doppelimmundiffusion in Gegenwart von Triton- X 100 (siehe 2.2.14. b) der Antikörper Anti α, Anti β und Anti γ gegen die einzelnen denaturierten Untereinheiten der Phos-

phorylase Kinase bilden diese Antikörper nur mit der Untereinheit eine Präzipitationslinie, die als Immunogen verwendet wurde (siehe Abbildung 10). Eine Kreuzreakton eines Antikörpers mit den übrigen Untereinheiten ist nicht nachweisbar. Bei Antiδ läßt sich in keinem Fall eine Präzipitationsreaktion nachweisen.
Bei Doppeldiffusion in Gegenwart von Triton gegen ein Gemisch der vier denaturierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase kommt es zwischen Anti α und Anti γ sowie zwischen Anti β und Anti γ zur "Spur"- Bildung (CROWL, 1975), einer Reaktion der "partiellen Identität". Die "Spur"- Bildung ist zwischen Anti α und Anti β nur andeutungsweise zu erkennen. Dieser Befund deutet auf eine teilweise Reassoziation der Untereinheiten hin (siehe Abbildung 34).
Bei Doppeldiffusion von Anti α, Anti β und Antiγ gegen das native Holoenzym sind in jedem Fall Präzipitationslinien nachweisbar (Identitätsreaktion), es kommt jedoch nicht zur "Spur"- Bildung. Auch hier ist eine Reaktion von Antiδ nicht nachweisbar (siehe Abbildung 35).
Die Existenz spezifisch gegen die gereinigteδ - Untereinheit gerichtete Antikörper im Antiδ wurde mit Hilfe des Mikro- Komplement- Bindungstestes nachgewiesen (VEH et al., 1980).



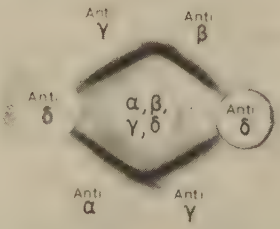


Abb. 34: Doppelimmundiffusion in Gegenwart von Triton- X 100 (siehe 2.2.14.b) eines Gemisches der denaturierten Untereinheiten α, β, γ und δ gegen Anti α, Anti β, Anti γ und Anti δ.

Es wurden aufgetragen: Gemisch der 4 Untereinheiten, insgesamt 16 µg in äquimolaren Verhältnissen, Antiseren je 20 µl.

Abb. 35: Doppelimmundiffusion der nativen Phosphorylase Kinase in detergenzfreiem Puffer gegen Anti α, Anti β Anti γ und Anti δ (siehe 2.2.14.a).

Es wurden aufgetragen: Phosphorylase Kinase (Holoenzym, nativ) 16 µg, Antiseren je 20 µl.

4.3.2. Herstellung von Antikörpern gegen die Ca^{2+}- Transport ATPase des sarkoplasmatischen Retikulum

Zur Immunisierung (siehe 2.1.15.) wurde die nach der unter 2.1.11. beschriebenen Methode aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in denaturierter Form gewonnene Ca^{2+}- Transport ATPase benutzt.

4.3.2.1. Untersuchung der hemmenden Eigenschaften der Anti-ATPase auf die Aktivität der Ca^{2+}- Transport ATPase

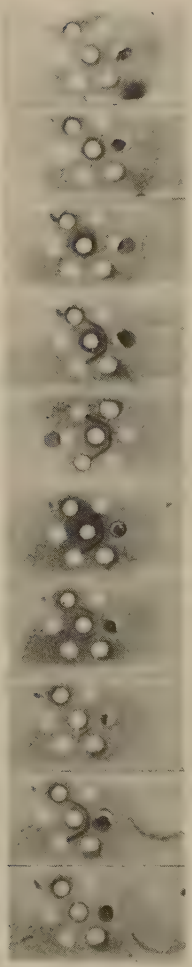
Untersuchungen über die Entwicklung des Hemmtiters oder über die konzentrationsabhängige Hemmung der Anti- ATPase, wie sie bei den Antikörpern gegen die Untereinheiten der

Phosphorylase Kinase durchgeführt wurden, können im Falle der Anti- ATPase nicht unternommen werden, da keinerlei hemmende Aktivität der Anti- ATPase auf die Enzymaktivität der Ca^{2+}- Transport ATPase festgestellt werden konnte.

4.3.2.2. Präzipitationsverhalten und Entwicklung des Titers präzipitierender Antikörper gegen die Ca^{2+}- Transport ATPase

Bei Immundoppeldiffusion in Gegenwart von Triton- X 100 (siehe 2.2.14.b) zeigt die Anti- ATPase nur mit ihrem eigenen Antigen und mit Proteingemischen, in denen das Antigen enthalten ist (z.B. denaturierte Vesikel des sarkoplasmatischen Retikulum) Präzipitationsreaktionen der Identität (siehe Abbildung 36). Keine Präzipitationslinien sind festzustellen mit einem Gemisch der beiden anderen denaturierten Hauptkomponenten des sarkoplasmatischen Retikulum Calsequestrin und "Acidic proteins", der denaturierten Phosphorylase b und der denaturierten Phosphorylase Kinase.
Die Titerhöhe der präzipitierenden Antikörper ist abhängig von der Zeit nach Erstimmunisierung. Die ersten präzipitierenden Antikörper können 35 Tage nach Erstimmunisierung nachgewiesen werden (siehe Abbildung 36). Danach steigt der Titer bis zum 56. Tag an, um dann wieder abzufallen und am 70. Tag nach Erstimmunisierung ein Minimum zu erreichen. Anschließend steigt der Titer nochmals an (84. Tag), um dann am 97. Tag nach Erstimmunisierung wieder völlig zu verschwinden.
Eine Korrelation der Titerhöhen der präzipitierenden und hemmenden Antikörper gegen die Ca^{2+}- Transport ATPase in Abhängigkeit von der Zeit nach Erstimmunisierung ist nicht möglich, da zu keinem Zeitpunkt während des Immunisierungsvorganges hemmende Antikörper nachgewiesen werden konnten.

Tage nach Erstimmunisierung:



0

8

15

36

43

57

64

71

85

92

Abb. 36: Doppelimmundiffusion in Gegenwart von Triton- X 100 (siehe 2.2.14.b) von Anti- ATPase gegen Ca^{2+}- Transport ATPase, sarkoplasmatisches Retikulum, Calsequestrin, "Acidic proteins", Phosphorylase b und Phosphorylase Kinase.

Es wurde aufgetragen: 20 µl Anti- ATPase, die zu verschiedenen Zeitpunkten nach Erstimmunisierung gewonnen wurde, in die zentralen Löcher. Periphere Löcher: 1. 15 µg denaturierte Vesikel, 2. 34 µg denaturierte Vesikel, 3. 20 µg Ca^{2+}- Transport ATPase, 4. 16 µg Calsequestrin und "Acidic proteins", 5. 13 µg denaturierte Phosphorylase b, 6. 16 µg Phosphorylase Kinase.

4.4. Lokalisationsstudien zu den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase

Bisherige mikroskopische Untersuchungen mit FITC- markierten Antikörpern gegen das Holoenzym Phosphorylase Kinase, also einem Antikörpergemisch bestehend aus Anti α, Anti β, Anti γ und eventuell Anti δ zeigen neben der Anfärbung streifiger Strukturen innerhalb der Muskelzelle eine besonders starke Anfärbung des Sarkolemms. Kürzlich wurde gezeigt, daß die Anfärbung des Sarkolemms wahrscheinlich auf einer Anfärbung der extrazellulär gelegenen Basalmembran beruht (GRÖSCHEL- STEWART et al., 1978).
Eine differenzierte Untersuchung der Lokalisation und Verteilung der Phosphorylase Kinase in der Muskelzelle wurde erst durch FITC- markierte Antikörper gegen die einzelnen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase möglich.
Unter den verwendeten Bedingungen gibt das jeweilige FITC-markierte Kontrollserum (siehe Abbildung 37) keine signifikante Anfärbung eines Muskelschnittes (Negativkontrolle). Als positive Kontrolle ist in der Abbildung 38 die Anfärbung eines Kaninchenzwerchfelles mit FITC- markierten Antikörpern gegen das Holoenzym Phosphorylase Kinase gezeigt. Besonders gut ist die starke Anfärbung des Sarkolemms zu erkennen, die gleichzeitig die einzelnen Muskelzellen voneinander abgrenzt. Das wabige weniger stark angefärbte Muster im Innern der Muskelzellen stellt die Begrenzung der Cohnheim'schen Felder dar (BLOOM und FAWCETT, 1975).

4.4.1. Anfärbung von Gewebeschnitten mit den FITC- markierten Antikörpern gegen die einzelnen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase

Auf einem Muskelquerschnitt färbt jeder der 4 Antikörper Anti α, Anti β, Anti γ und Anti δ für sich feine streifige Strukturen im Innern der Muskelzelle an (siehe Abbildung 39). Diese Strukturen stellen die Ränder von kleinen viereckigen und teils polygonalen dunklen Flächen dar. Werden solche Strukturen flach oder schräg geschnitten, erscheint

Abb. 37: Immunfluoreszenzbild eines Zwerchfellquerschnittes angefärbt mit Kontrollserum.

Bedingungen: Kontrollserum 9 mg/ml, 4 FITC/Mol, Vergrößerung ca. 1000fach, Leitz- Ortoplan mit Mikroskopkamera- Automat, Fluoreszenzauflicht-illuminator nach Ploem.
Für weitere Angaben siehe 2.1.17.

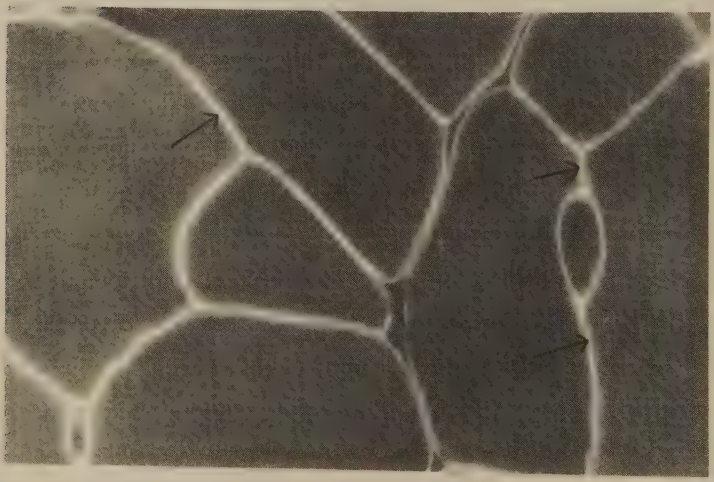


Abb. 38: Immunfluoreszenzbild eines Zwerchfellquerschnittes angefärbt mit FITC- markierter Anti- Holokinase.
Antikörperlösung 3,3 mg/ml, 4 FITC/Mol, Vergrößerung ca. 1000fach,
Für weitere Angaben siehe Legende zur Abbildung 37.
→ Sarkolemm

ein streifiges Bild. Die dunklen Felder, die man sich durch die FITC- markierten Antikörper eingerahmt denken kann, werden Cohnheim'sche Felder genannt und enthalten den kontraktilen Apparat, der durch Anfärbung eines Muskelschnittes mit FITC- Anti- Myosin sichtbar gemacht werden kann. Der Rand der Cohnheim'schen Felder, der von allen 4 Antikörpern angefärbt wird, entspricht in seiner Verteilung dem sarkoplasmatischen Retikulum, was möglicherweise ein Hinweis auf die Lokalisation der Phosphorylase Kinase ist.

4.4.2. Anfärbung zusätzlicher Strukturen der Muskelzelle durch FITC- markiertes Anti α und Anti δ

Nur Anti α und Anti δ färben neben den Begrenzungen der Cohnheim'schen Felder auch das Sarkolemm an, was von einer Reaktion der Antikörper mit der Plasmamembran und (oder) der Basalmembran hervorgerufen werden kann.
Bei Anfärbung mit Anti α (siehe Abbildung 39 A) ist das Sarkolemm stärker angefärbt als die Strukturen im Sarkoplasma verglichen mit der Stärke der Anfärbung dieser Strukturen durch FITC- markierte Anti- Phosphorylase Kinase. Anti δ färbt das Sarkolemm ganz schwach an (siehe Abbildung 39 D). Bei niedriger Antikörperkonzentration ist diese Anfärbung praktisch nicht sichtbar. Inkubiert man FITC-markiertes Anti δ mit Phosphorylase Kinase oder der isolierten δ - Untereinheit bevor man den Antikörper auf das Gewebe gibt, so kann keinerlei Anfärbung des Gewebes mehr beobachtet werden.
Mit den bisherigen Untersuchungen konnte nicht gezeigt werden, ob die Basalmembran oder die Plasmamembran durch Anti α und Anti δ angefärbt wird, da in der quergestreiften Muskelzelle beide Strukturen nebeneinander im Sarko-

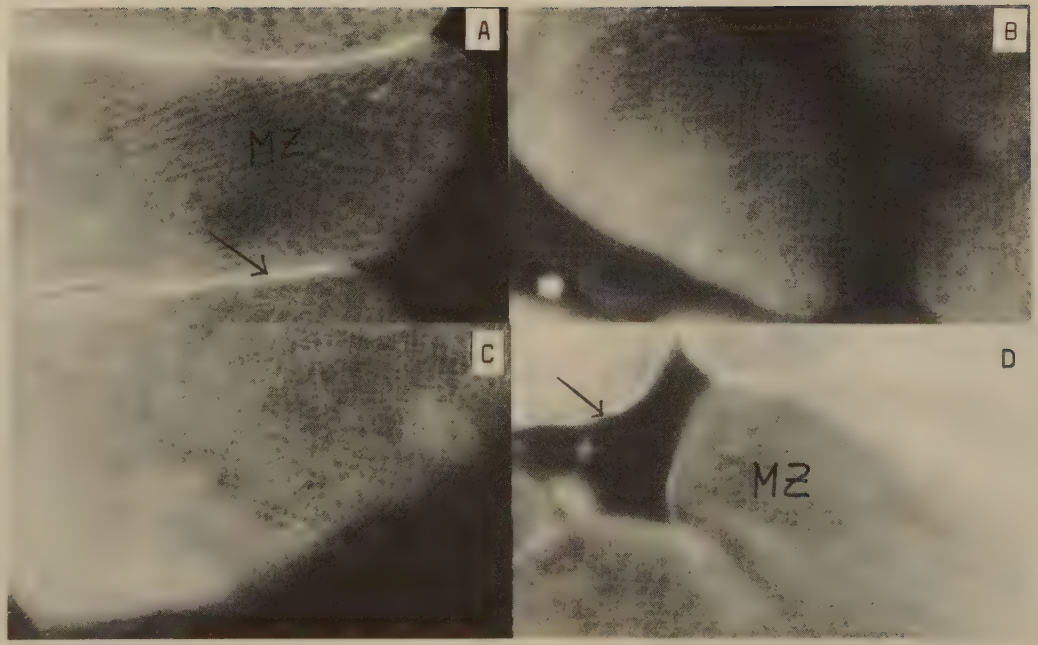


Abb. 39: Lokalisation der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase in der Skelettmuskelzelle mit FITC- markierten, monospezifischen Antikörpern.

Anfärbung von M. Psoasquerschnitten mit Anti α (A), Anti β (B), Anti γ (C) und Anti δ (D).
Antikörperlösungen: 5 mg/ml, 2- 3 FITC/Mol,
Vergrößerung ca. 2700 x, Ölimmersion,
Leitz- Ortoplan mit Mikroskopkamera- Automat, Fluoreszenzauflichtilluminator nach Plöm. Für weitere Angaben siehe 2.1.17.
MZ: Muskelzelle
→: Sarkolemm

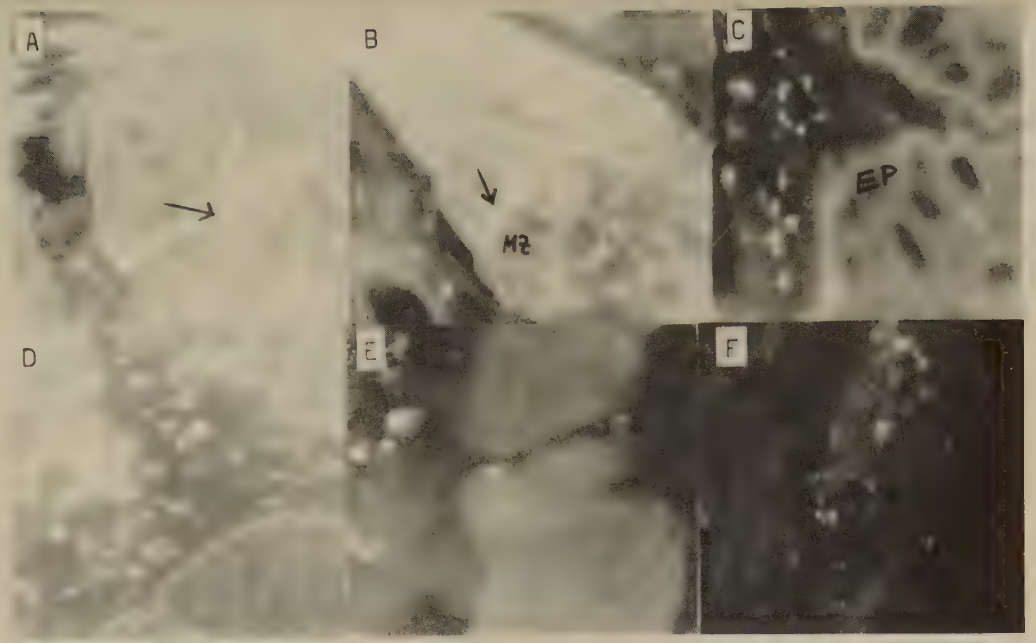


Abb. 40: Differenzierung der Anfärbung der Basalmembran oder der Plasmamembran mit FITC-markiertem Anti α und Anti σ.

Anfärbung von Ösophagusschnitten mit FITC- Antiα: A- C, Anfärbung mit Antiσ: D- F.
A + D: quergestreifte Muskulatur, Vergrößerung 2700 x, Ölimmersion
B + E: glatte Muskulatur, Vergrößerung 2700 x, Ölimmersion
C + F: subepitheliales Gewebe, Vergrößerung 2700 x, Ölimmersion
Antikörperlösungen: 5 mg/ml, 2- 3 FITC/mol,
Für weitere Angaben siehe Legende zur Abbildung 39.
MZ: Muskelzelle
EP: Epithel
→: Sarkolemm

lemm nebeneinander vorliegen. Deshalb werden Untersuchungen an verschiedenen Geweben vorgenommen, in denen die Basalmembran isoliert von der Plasmamembran vorkommt. Wie die Abbildung 40 A- C zeigt, färbt Anti α die Basalmembran an, welche in Abwesenheit einer Plasmamembran die Zellen der glatten Muskulatur umgibt (siehe Abbildung 40 B), während mit Antiδ keine Anfärbung feststellbar ist (siehe Abbildung 40 D- F).
Aus diesem Befund muß geschlossen werden, daß Anti α in der quergestreiften Muskelzelle die Basalmembran anfärbt, während Antiδ die Plasmamembran anfärbt. Es liegt die Vermutung nahe, daß die α- Untereinheit oder ein Antigen mit Sequenzhomologien zu dieser isoliert von den anderen drei Untereinheiten der Phosphorylase Kinase in der Basalmembran vorliegt. Entsprechendes gilt im Falle der δ- Untereinheit für die Lokalisation in der Plasmamembran.

4.5. Untersuchung der Verteilung von Phosphorylase b, Ca^{2+}-Transport ATPase und Glycogen in der quergestreiften Muskelzelle

Zur Lokalisierung der der Phosphorylase b und der Ca^{2+}-Transport ATPase werden Muskelschnitte mit FITC- markierter Anti- Phosphorylase b (siehe Abbildung 41 B) bzw. Anti-Ca^{2+}- Transport ATPase (nicht gezeigt) angefärbt. Die beiden Antikörper geben eine identische Anfärbung der Muskelzelle. Auf Muskellängsschnitten kann eine Längs- und eine Querstreifung beobachtet werden. Die Abstände zwischen den Querstreifen betragen ca. 1,5 µm, die Abstände zwischen den Längsstreifen etwa 1- 2 µm. Bei Inkubation von Muskelquerschnitten werden wie bei der Anti- Phosphorylase Kinase (siehe Abbildung 41 A) die Ränder der Cohnheim'schen Felder angefärbt.
Zur Lokalisierung des Glycogens in der Muskelzelle wird dieses durch eine PAS (periodic acid Schiff reaction) sichtbar gemacht (siehe Abbildung 41 C). Wie in den beiden anderen Fällen werden bei der Anfärbung von Längsschnitten Längsstreifen und Querstreifen sichtbar, die gleiche Ab-

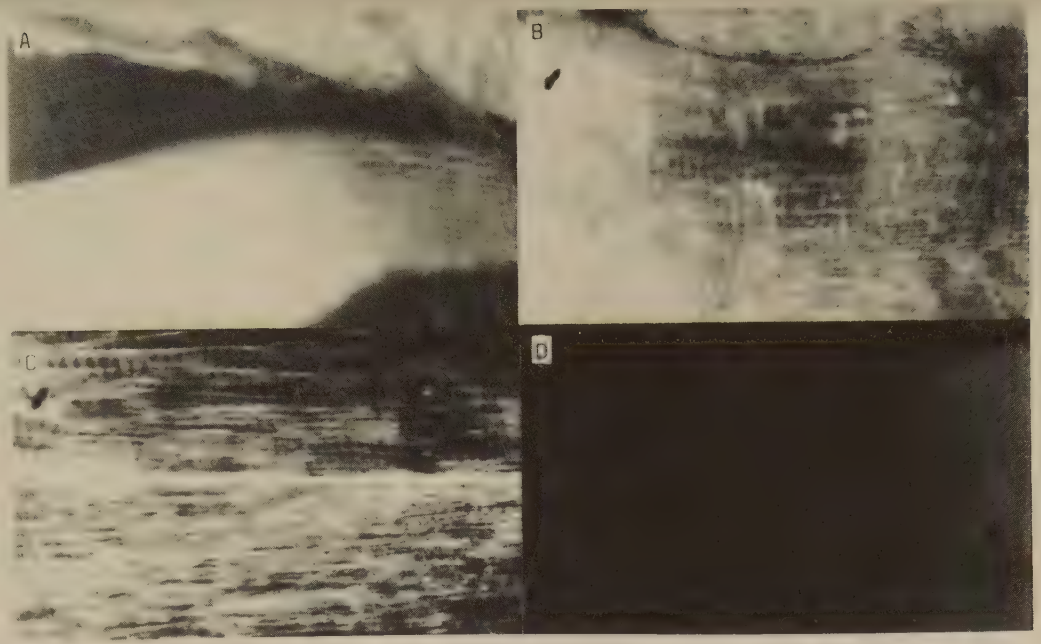


Abb. 41: Beweis der identischen Verteilung der Phosphorylase Kinase, Phosphorylase b und Glycogen in der Skelettmuskelzelle.

Anfärbung von M. Psoaslängsschnitten mit Anti γ , exemplarisch für die Phosphorylase Kinase (A), Anti- Phosphorylase b (B), Kontrollseren, siehe Text (D). In (C) wurde das Glycogen der Muskelzelle durch eine PAS- Färbung sichtbar gemacht.
Antikörperlösungen: 5 mg/ml, 2- 3 FITC/Mol,
Vergrößerung ca. 2700 x, Ölimmersion,
Für weitere Angaben siehe Legende zur Abbildung 39.

stände voneinander aufweisen wie bei der Ca^{2+}- Transport ATPase und der Phosphorylase b. In Muskelquerschnitten werden die Grenzen der Cohnheim'schen Felder angefärbt. Parallel zu diesen Experimenten wurden folgende Kontrollen durchgeführt, die aber alle negativ ausfielen (siehe Abbildung 41 D):

a) Anfärbung mit Präimmunserum,
b) Anfärbung mit FITC- markierten Antikörpern, die mit ihrem Antigen vorinkubiert wurden,
c) Anfärbung von Schnitten, die mit nicht markierten Antikörpern vorinkubiert wurden.

Die Befunde dieser Lokalisationsexperimente deuten sehr stark auf eine identische Verteilung der Phosphorylase Kinase, der Ca^{2+}- Transport ATPase, der Phosphorylase b und des Glycogens im interfibrillären Raum der Muskelzelle hin.

5. Diskussion

5.1. Zur Problematik des "Subunit exchange"

Turnoverstudien an oligomeren Proteinen mit heterologen Untereinheiten wurden bisher am Myosin (WIKMAN- COFFELT et al., 1973; LOW und GOLDBERG, 1973; ZAK et al., 1977; KOIZUMI, 1974), am Troponin (KOIZUMI, 1974; MARTIN, 1981), Hämoglobin (GODEAU et al., 1976) und den Ribosomen (DICE und SCHIMKE, 1972) durchgeführt. In allen Fällen gibt es Anzeichen, daß die heterologen Untereinheiten einen unterschiedlichen Turnover besitzen.
Die Aussagen verschiedener Arbeitsgruppen über die Höhe der relativen Turnoverraten sind bei einigen Proteinen unterschiedlich. So gibt es beim Myosin Befunde, die über einen höheren, gleichen und auch niedrigeren Turnover der leichten gegenüber den schweren Ketten sprechen. Aus dieser Diskrepanz wird deutlich, daß Turnoverexperimente bei nicht richtiger Anwendung und Berücksichtigung aller Voraussetzungen zu falschen Ergebnissen führen können.
Was bedeutet es nun für ein oligomeres Protein, das aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut ist, die einen heterologen Turnover aufweisen? Für die Synthese und Degradation eines solchen Proteins muß gefolgert werden, daß es nicht als Holo- Protein, sondern daß jede einzelne Untereinheit für sich synthetisiert und degradiert wird. Es liegt also kein statisches Protein vor, vielmehr müssen die einzelnen Untereinheiten im Molekül laufend ausgetauscht werden ("Subunit exchange").
Unter dem Begriff "Subunit exchange" wird der Austausch eines individuellen Polypeptids, das sich als Untereinheit in einem Proteinkomplex gebunden befindet, mit einem korrespondierenden Protein aus einem cytoplasmatischen Pool verstanden. Drei denkbare Modelle könnten den Mechanismus des "Subunit exchange" erklären (MARTIN, 1981):
1. Das oligomere Protein dissoziiert völlig in seine Untereinheiten und reassoziiert mit neuen Komponenten. Dabei werden Proteine mit einem niedrigen Turnover mehr "recycled"

als Proteine mit einem höheren Turnover.
2. Von dem oligomeren Protein wird zeitweise jeweils nur eine Untereinheit abdissoziiert und sofort durch eine entsprechende neue Untereinheit ersetzt, ohne daß das ganze Enzym dissoziiert.
3. Das entsprechende Polypeptid wird, während es weiterhin das oligomere Protein gebunden bleibt, von Proteasen degradiert und anschließend von einer entsprechenden Untereinheit ersetzt.
In den beiden ersten Fällen geht eine Dissoziation der betrachteten Untereinheit aus ihrem Komplex der Degradation dieser Untereinheit voraus. Im dritten Fall, wo eine Degradation der erste Schritt ist, wäre es denkbar, daß endogene Proteasen die Untereinheiten proteolytisch angreifen.
HOLROYDE et al. (1980) berichten, daß isoliertes, natives Troponin aus Herzmuskulatur in vitro sehr instabil ist und führen dies auf endogene oder mitgereinigte Proteasen zurück. Andere Arbeiten beschreiben die Anwesenheit von Proteasen an Myofibrillen von Herz- und Skelettmuskulatur (REDDY et al., 1975; DAYTON et al., 1976).
Erste Hinweise über einen heterologen Turnover der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase beschrieben bereits JENNISSEN et al. (1975). Die Messungen über den initialen Einbau von ^{3}H- Leucin sprachen für einen unterschiedlichen Turnover der $\alpha+\beta$- Untereinheiten von der γ- Untereinheit. Die δ- Untereinheit war damals noch nicht bekannt.
Dieser Befund konnte erhärtet und ausgeweitet werden. Es wird ein unterschiedlicher Turnover aller vier Untereinheiten gefunden und zwar in der folgenden Reihenfolge: $\delta > \gamma > \alpha > \beta$.
Eine Entscheidung für eines der oben genannten Modelle des "Subunit exchange" konnte nicht getroffen werden. Immunologische Untersuchungen mit FITC- markierten Antikörpern gegen die isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase aber sprechen für ein möglicherweise vom Holoenzym isoliertes Vorkommen der Untereinheiten α und δ.
Einen ersten direkten Hinweis auf einen möglichen "Subunit

exchange" bei der Phosphorylase Kinase fanden PICTON et al. (1980). Bei Inkubation von Phosphorylase Kinase mit ^{14}C-markierter δ - Untereinheit in vitro wurde ein Austausch der Untereinheiten festgestellt, der aber mindestens um den Faktor 50 langsamer verlief als er nach unseren Berechnungen in vivo verlaufen müßte.
Im Zusammenhang mit der δ - Untereinheit gibt es in dieser Arbeit schließlich Hinweise auf verschiedene Aminosäurepools in der Muskelzelle.

5.2. Bestimmung der relativen Turnoverraten aus den initialen Einbauraten

Wie unter 3.1. gezeigt, ist unter initialen Bedingungen die spezifische Radioaktivität inkorporierter Aminosäuren proportional der Turnoverkonstanten k_p.
Die vom Computer berechneten P^*- Kurven (siehe Abbildung 23) steigen bis zum 0,5.Tag nach Pulsmarkierung scheinbar linear an, ein Zeichen dafür, daß in diesem Bereich die Degradation markierter Proteine vernachlässigbar ist (initiale Bedingungen). Eine Tangente, die vom Nullpunkt durch den Wert der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Proteinen des 0,5. Tages an die vom Computer angepaßten P^*- Kurven gelegt wird, erreicht bei allen 4 Untereinheiten die experimentell bestimmte spezifische Radioaktivität des 1. Tages. Da die Synthese der Proteine nach einer Reaktion 0. Ordnung verläuft (JOHNSON und VELICK, 1972), wird in der vorliegenden Arbeit der initiale Kurvenbereich vom 0. bis zum 1. Tag nach Pulsmarkierung ausgewertet.
Bei diesen Messungen wird nicht das Maß an Genauigkeit wie bei den späteren Versuchen erreicht, da in dem initialen Kurvenbereich nur 3 Punkte vorliegen, von denen einer als Nullpunkt angenommen ist.
Wertet man die experimentellen Werte und die vom Computer berechneten Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins zwischen den Tagen 0 und 1 aus, so erhält man im Falle der drei großen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase aus den experimentellen Werten Einbauraten, die um 25 % über

den aus der computerberechneten Kurven liegen. Da die Abweichung in allen drei Fällen nahezu gleich groß ist, ergeben sich letztlich aus den initialen Einbauraten der experimentellen Werte und der vom Computer berechneten Werte gleiche relative Turnoverraten. Wie in 5.3. diskutiert wird, verändern sich die relativen Turnoverraten nur unwesentlich, wenn die initialen Bedingungen überschritten werden.

Obwohl die im initialen Kurvenbereich gelegenen Punkte von der Versuchstechnik her mit dem theoretisch größten Fehler belastet sind, da in diesem Kurvenbereich die Änderung der spezifischen Radioaktivität pro Zeit am größten ist, beträgt der Fehler nur 2 %, wenn bei dem Turnoverexperiment des 1. Tages die Inkorporationsdauer um 1/2 Stunde überschritten worden wäre, was aber nicht der Fall war.

Geordnet nach der Höhe ihrer Einbauraten und damit auch nach der Höhe ihrer relativen Turnoverraten ergibt sich folgende Reihenfolge der Proteine: γ , $\alpha > \beta > \sigma$. Diese Interpretation gilt nur, wenn die untersuchten Proteine aus einem gemeinsamen Aminosäurepool synthetisiert werden, da die spezifische Radioaktivität des Präcursorpools direkt in die Höhe der spezifischen Radioaktivität der Proteine eingeht.

Die Grundlagen der Turnovermessung nach der Methode der initialen Einbauraten, die heute nicht mehr viel Anwendung findet, stammen von Velick (SIMPSON und VELICK, 1954; HEIMBERG und VELICK, 1954; SIMPSON, 1955; VELICK, 1956). Seine wichtigsten Ergebnisse sollen hier kurz aufgeführt werden:

1. Durch Pulsmarkierung mit bis zu 5 verschiedenen markierten Aminosäuren stellte er fest, daß die Einbauquotienten der untersuchten Aminosäuren in jeweils zwei zu vergleichenden Proteinen gleich waren. Daraus folgerte er, daß wahrscheinlich Aldolase, GAPDH, Aktin, Phosphorylase b und H- Meromyosin aus einem gemeinsamen Präcursorpool synthetisiert werden.

2. Der oben beschriebene Quotient gibt die relative Turnoverrate an. Über die Halbwertszeit von 4 Tagen für Serumalbumin (MCFARLANE, 1952) berechnete Velick aus den rela-

tiven Turnoverraten Halbwertszeiten für die untersuchten Muskelproteine. Im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit errechneten Halbwertszeiten für die Phosphorylase b und die GAPDH lagen die entsprechenden Werte von Velick um den Faktor 5- 10 höher. Er selbst schränkt die Gültigkeit seiner Angaben mit dem Hinweis ein, daß sie fehlerhaft seien, falls das Serumalbumin und die Muskelproteine nicht aus einem gemeinsamen Präcursorpool synthetisiert würden.
3. Er untersuchte den Metabolismus von Aminosäuren und stellte fest, daß besonders Alanin, Phenylalanin und Glycin in der Art abgebaut werden, daß die metabolischen Abbauprodukte zu einer Markierung anderer Aminosäuren führen. Nach Pulsmarkierung mit den 5 radioaktiv markierten Aminosäuren Glycin, Alanin, Lysin, Phenylalanin und Methionin fand er nach 38 Stunden Inkorporation in den Hydrolysaten der markierten Enzyme 11 radioaktiv markierte Aminosäuren wieder.
4. Da auch schon zu sehr frühen Zeitpunkten nach Pulsmarkierung (30 Minuten) unabhängig von der Position in der Kette markierte Aminosäuren eingebaut werden, folgerte er, daß Aminosäuren die Präcursoren der Proteinsynthese sind und nicht kleinere Peptide, was damals diskutiert wurde.
5. Das Myosin scheint aus verschiedenen Untereinheiten aufgebaut zu sein, die unabhängig voneinander synthetisiert und degradiert werden, da das H- und das L- Meromyosin scheinbar verschiedene relative Turnoverraten aufweisen und anscheinend aus unterschiedlichen Präcursorpools synthetisiert werden.
Etwa 20 Jahre später konnte KOIZUMI (1974) nach der Methode von Velick dessen Werte für die apparente Halbwertszeit von Myosin und Actin bestätigen. Übereinstimmend berichten Velick und Koizumi, daß die metabolischen Abbauprodukte des Leucins nicht zur Markierung anderer Aminosäuren führen, ein Befund, der in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte (siehe 4.2.1.).

5.3. Ermittlung der relativen Turnoverraten aus den maximalen Einbauraten (dP/dt=0)

Wie unter 3.1. beschrieben und aus der Abbildung 3 zu ersehen, können relative Turnoverraten aus der absoluten Höhe der Maxima der Verlaufskurven für die spezifische Radioaktivität des Leucins in den Proteinen bestimmt werden. Unter idealen Bedingungen, die jedoch im Experiment kaum zu erreichen sind, wird die Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität in den Proteinen von der Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität im Präcursorpool im Maximum geschnitten, so daß aus der Lage der maximalen spezifischen Radioaktivität im Protein theoretisch zwei Möglichkeiten zur Berechnung der relativen Turnoverraten vorliegen (ZAK et al., 1979): einmal aus der absoluten Höhe der spezifischen Radioaktivität (y- Achse) und aus der Lage des Maximums bezogen auf die Zeit (x- Achse). Im Gegensatz zu der Berechnung der relativen Turnoverraten aus den initialen Einbauraten besteht hier keine lineare Beziehung zwischen der spezifischen Radioaktivität und der relativen Turnoverrate (siehe Abbildung 3).
Im Maximum der Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität in den drei größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase, das als breites Plateau zwischen den Tagen 1- 5 nach Pulsmarkierung liegt, streuen die experimentellen Punkte um einen Maximalwert (siehe Abbildung 21). Aus der Lage der Punkte ist die Ermittlung des Zeitpunktes des Kurvenmaximums nicht möglich. Da die Punkte nach einem Test auf "Nicht- Normalität" (DAVID et al., 1954) normal verteilt um einem Mittelwert liegen, wird dieser als mittleres Kurvenmaximum angenommen. Ein Vergleich mit den vom Computer errechneten P_i^*- Kurven zeigt, daß die errechneten Maxima innerhalb der Fehlergrenzen des Mittelwertes liegen. Die experimentell ermittelten maximalen spezifischen Radioaktivitäten sind nach dem Student T- Test und dem einseitigen nichtparametrischen Wilcoxon Test (WILCOXON, 1949) signifikant verschieden. Für eine Stichprobengröße von 5 Punkten ist nur der einseitige Wilcoxon Test verwendbar.

Danach besteht zwischen zwei Punktemengen mit z.B. je 5 Punkten ein signifikanter Unterschied ($p<0,05$), wenn alle Punkte der einen Menge in der gleichen Richtung von den Punkten der anderen Menge abweichen. Da kein Plateau vorliegt, wird bei der δ- Untereinheit das Mittlere Maximum aus den spezifischen Radioaktivitäten aus zwei Punkten (Tage 1 und 2) errechnet. Dennoch ist diese mittlere maximale Radioaktivität ebenfalls signifikant verschieden von den anderen maximalen spezifischen Radioaktivitäten.
Da die mittleren maximalen spezifischen Radioaktivitäten alle signifikant verschieden sind, läßt sich auf einen unterschiedlichen Turnover der 4 Untereinheiten der Phosphorylase Kinase mit folgender Reihenfolge schließen: $\gamma > \alpha > \beta > \delta$. Es ergibt sich die gleiche Reihenfolge wie aus den initialen Einbauraten, obwohl der initiale Bereich schon lange überschritten ist. Nach der in diesem Kapitel diskutierten Methode ist es also möglich, die Reihenfolge der Turnoverraten nach der Höhe des Maximums festzulegen. Das gilt nur bis zu dem Moment, wo die erste Verlaufskurve eine andere schneidet, was in der vorliegenden Arbeit am 8. Tag nach Pulsmarkierung der Fall war. Es wird jedoch vorausgesetzt, daß alle untersuchten Proteine aus einem Aminosäurepool synthetisiert werden.
Eine experimentelle Anwendung der Bestimmung relativer Turnoverraten aus den maximalen Einbauraten konnte in der Literatur nicht gefunden werden. Lediglich ZAK et al. (1979) beschreiben sie als theoretische Möglichkeit, verwerfen sie aber wieder mit der Begründung, daß das Maximum zeitlich nicht genau festgelegt werden könne, eine Bedingung, die, wie diese Arbeit zeigen konnte, gar nicht notwendig ist.

5.4. Ermittlung der relativen Turnoverraten aus den apparenten Geschwindigkeitskonstanten des Abbaus

Die Steigung der halblogarithmischen Degradationsgeraden ist proportional der apparenten Turnoverkonstanten k_p. Aus ihr können apparente Halbwertszeiten der Proteine

berechnet werden (siehe 3.1.).
Zwischen den Tagen 6 und 21 nach Pulsmarkierung lassen sich die experimentellen Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den 4 Untereinheiten der Phosphorylase Kinase halblogarithmisch mit einer Geraden anpassen (siehe Abbildung 22). Die Korrelationskoeffizienten liegen zwischen 0,94 und 0,99. Nur die apparenten k_p- Werte der Paare α-β und α-γ sind nicht signifikant verschieden. Die Folgerung aus diesen Daten ist im Gegensatz zu den bisherigen Befunden, daß die δ- Untereinheit von allen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase den höchsten Turnover besitzt: $\delta > \gamma(\alpha) > \beta(\alpha)$. Klarheit über das tatsächliche Turnoververhalten der δ- Untereinheit können nur weitere Experimente und Auswertungsmethoden bringen. An dieser Stelle wird deutlich, daß eine Methode zur Turnoverbestimmung möglicherweise nicht ausreichend ist, da sie zu falschen Ergebnissen führen kann.
Die in diesem Kapitel diskutierte Methode zur Bestimmung des Turnovers ist unabhängig von der absoluten spezifischen Radioaktivität im Protein und im Präcursorpool. Durch diese Methode werden nur Änderungen der spezifischen Radioaktivität pro Zeit bestimmt. Dadurch wird es möglich, auch relative Turnoverraten von Proteinen aus unterschiedlichen Präcursorpools zu untersuchen und miteinander zu vergleichen, wenn die Steigung der F*- Kurven gleich sind. Die aus den apparenten Degradationskonstanten bestimmten Halbwertszeiten der Proteine sind - verglichen mit den tatsächlichen Halbwertszeiten - zu lang (siehe Tabelle 21). Die Aldolase aus Rattenmuskulatur ist eines der ersten Enzyme, für welches nach Pulsmarkierungsexperimenten mit ^{14}C- Glycin über einen Zeitraum von 80 Tagen aus der Steigung der Verlaufskurve eine Halbwertszeit von 20 Tagen ermittelt wurde (SCHAPIRA et al., 1960). Die Autoren diskutieren, daß die Halbwertszeit wegen des "Recyclings" des ^{14}C- Glycins zu lang sei und nur einen maximalen Wert darstelle.
Um die Problematik des "Recyclings" zu umgehen, gab es die verschiedensten methodischen Ansätze. Mit Pulsmarkierungs-

experimenten über 1- 7 Tage untersuchten ARIAS et al. (1969) Halbwertszeiten von subzellulären Fraktionen der Rattenleber. In Prallelversuchen wurde einmal ^{14}C-Guanidino-L-Arginin und einmal ^{14}C-L-Arginin (alle C- Atome markiert) injiziert. Die ermittelten Halbwertszeiten für die mit ^{14}C-Guanidino-L-Arginin markierten subzellulären Fraktionen lagen um den Faktor 1,2- 2,9 unter den Halbwertszeiten, die nach Markierung mit ^{14}C-L-Arginin ermittelt wurden. Wie SWICK und HANDA (1956) zeigen konnten, ist das "Recycling" von ^{14}C-Guanidino-L-Arginin sehr gering, da die Arginase der Leber den markierten Guanidino- Kohlenstoff abspaltet, welcher anschließend im Harnstoff ausgeschieden wird. Das in der vorliegenden Arbeit zur in vivo Markierung der Proteine verwendete ^{3}H- Leucin zeigt ein mit dem ^{14}C-L-Arginin vergleichbar starkes "Recycling" wie BEATTIE et al. (1967) zeigen konnten. Sie bestimmten mit ^{14}C- Leucin, aber sonst unter identischen Bedingungen wie Arias et al. die Halbwertszeit der Mitochondrienfraktion aus Rattenleber auf 8,6 Tage. ARIAS et al. (1969) ermittelten nach Markierung mit ^{14}C-L-Arginin 9Tagen mit ^{14}C-Guanidino-L-Arginin 6,8 Tage Halbwertszeit. Mit einer Halbwertszeit von 5- 6 Tagen für die gleichen Proteine, die SWICK et al., (1968) durch $^{14}CO_3^{2-}$- Infusion bestimmten, wurden die von Arias et al. durch Pulsmarkierung mit ^{14}C-Guanidino-L-Arginin ermittelten Halbwertszeiten am besten bestätigt.
Durch Pulsmarkierung mit ^{14}C- Leucin über 2 Tage untersuchten DÖLKEN und PETTE (1974) Turnoverraten von Enzymen der Glycolyse und Glycogenolyse aus verschiedenen Geweben des Kaninchens. Um bei der Auswertung zur Bestimmung der Halbwertszeiten einen möglichst kleinen Fehler zu machen, wurde der Anstieg der Verlaufskurve der spezifischen Radioaktivität im Protein dicht hinter dem Kurvenmaximum in einem kleinen Zeitraum (10- 50 Stunden) gemessen. Die so ermittelten Halbwertszeiten betrugen durchschnittlich etwa 1 Tag.
Die Anwendung der von Dölken und Pette vorgeschlagenen Auswertungsmethode auf die in der vorliegenden Arbeit experimentell ermittelten Verlaufskurven (siehe Abbildung 22)

und die vom Computer errechneten P_i^*- Kurven (siehe Abbildung 23) zwischen den Tagen 5- 8 führt in beiden Fällen zu analogen apparenten k_d- Werten, wie sie bereits aus der Steigung der halblogarithmischen, apparenten Degradationsgeraden 3- 21 Tage nach Pulsmarkierung errechnet worden sind (siehe Tabelle 14). Im Vergleich zu den aus den P_i^*-Kurven errechneten k_p- Werten sind die apparenten k_d- Werte um den Faktor 4 zu klein.
Die Ausführungen sollen zeigen, wie schwierig es ist, auf experimentellem Weg das "Recycling" der markierten Aminosäuren auszuschalten. Besonders bei den geschilderten vier verschiedenen Methoden zur Bestimmung des Turnovers von Mitochondrienproteinen aus Rattenleber wird deutlich, daß jede Methode ein anderes Ergebnis liefert. Erfolgversprechender erscheint deshalb das von ZILVERSMIT (1960) vorgeschlagene Verfahren, das "Recycling" der Aminosäuren mathematisch zu berücksichtigen.

5.5. Bestimmung relativer Turnoverraten mit dem Doppelmarkierungsexperiment

Die Doppelmarkierung ist die heute am meisten benutzte Methode zur Bestimmung relativer Turnoverraten. Vorteilhaft an dieser Methode ist, daß keine spezifischen Radioaktivitäten und keine Präcursorpools bestimmt werden müssen (ARIAS et al., 1969). Die Aussagekraft des Doppelmarkierungsexperimentes ist in erster Linie abhängig von der richtigen Wahl des Injektionszeitplanes. Nach ZAK et al. (1977) sollte die Inkorporationsdauer der ersten markierten Aminosäure nicht länger als 3 tatsächliche Halbwertszeiten (vom Computer berechnet) des Proteins mit dem höchsten Turnover der untersuchten Proteingruppe dauern. Eine weitere Ausdehnung der Inkorporationsdauer bewirkt wegen der sinkenden spezifischen Radioaktivität eine Zunahme der Meßungenauigkeit und eine Konvergenz der spezifischen Radioaktivitäten der untersuchten Proteine.
Am wichtigsten für die Empfindlichkeit der Doppelmarkierungsmethode ist die Inkorporationsdauer der zweiten markierten

Aminosäure. Sie sollte möglichst kurz sein, so daß bei allen Proteinen nur initial eingebaut wird, da unter diesen Bedingungen die Zunahme der spezifischen Radioaktivität pro Zeit am größten ist und die Halbwertszeit direkt proportional der spezifischen Radioaktivität ist (siehe 3.1.). Andererseits darf diese Inkorporationsdauer auch nicht zu kurz gewählt werden, da der radioaktive Einbau zu gering sein würde und damit die relativen Meßfehler steigen würden. Auch die Größe der tatsächlichen Halbwertszeit beeinflußt die Empfindlichkeit der Doppelmarkierungsmethode. Unter Verwendung eines im Rattenherz gemessenen Präcursorpools konnten ZAK et al. (1977) zeigen, daß wegen des "Recyclings" der Aminosäuren keine lineare Beziehung zwischen den $^{14}C/^{3}H$- Einbauquotienten und den Halbwertszeiten der Proteine besteht. Aus diesem Grund werden die Unterschiede zwischen den $^{14}C/^{3}H$- Einbauquotienten bei Proteinen mit längeren Halbwertszeiten immer kleiner. Das beschriebene System von Zak et al. unterscheidet am empfindlichsten zwischen tatsächlichen Halbwertszeiten, die im Bereich von 1,5 bis 5 Tagen liegen. Diese Aussage gilt aber nur für das beschriebene System, da sie abhängig ist von dem Verlauf des Präcursorpools. Weitere Voraussetzungen für die Anwendbarkeit der Doppelmarkierungsmethode wie identisches Einbauverhalten von ^{14}C- Leucin und ^{3}H- Leucin, sowie der linearen Beziehung zwischen der verabreichten Radioaktivitätsmenge und der Höhe des radioaktiven Einbaus wird in der gleichen Arbeit beschrieben (ZAK et al., 1977). Es konnte außerdem gezeigt werden, daß die Höhe des radioaktiven Einbaus lediglich abhängig ist von der Menge der gespritzten Radioaktivität und nicht von der spezifischen Radioaktivität der Aminosäure, da die verabreichte Menge an Leucin bei Pulsmarkierungsexperimenten vernachlässigbar klein ist gegenüber der Menge an freiem Leucin in den Aminosäurepools der Tiere. Eine weitere Voraussetzung für richtige Aussagen eines Doppelmarkierungsexperimentes ist der "Steady state"- Zustand. Bei dem Doppelmarkierungsexperiment in der vorliegenden Arbeit, das über einen Zeitraum von 21 Tagen lief,

betrug die mittlere Gewichtszunahme 8 %. Wie ZAK et al. (1977) an Ratten zeigen konnten, veränderte eine Gewichtszunahme von 15 % über 20 Tage die Halbwertszeiten von Proteinen nicht gegenüber Messungen zu frühen Zeitpunkten nach Pulsmarkierung. Da die Kaninchen in kleinen Käfigen gehalten wurden, wo sie sich nicht stark bewegen konnten und ad libitum mit Wasser und Trockenfutter gefüttert wurden, ist diese Gewichtszunahme sicherlich hauptsächlich auf Fetteinlagerungen und nicht auf Muskelwachstum zurückzuführen.

Die in dieser Arbeit für die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase ermittelten Einbauquotienten aus der Doppelmarkierung sind voneinander signifikant verschieden ($p<0,001$), was auf einen heterologen Turnover der 4 Untereinheiten und zwar mit folgender Reihenfolge: $\delta > \gamma > \alpha > \beta$. Im Falle der δ- Untereinheit steht dieser Befund im Gegensatz zu den Berechnungen der relativen Turnoverraten aus den initialen und den maximalen Einbauraten, wo die δ- Untereinheit den niedrigsten Turnover hatte, aber im Einklang zu dem Befund aus der Reihenfolge der apparenten k_d- Werte. Auf diesen scheinbaren Widerspruch wird unter 5.8. weiter eingegangen.

Ursprünglich war die Doppelmarkierungsmethode nur für die Ermittlung relativer Turnoverraten konzipiert (ARIAS et al., 1969). ZAK et al. (1977) bestimmen mit dieser Methode absolute Halbwertszeiten, indem sie nach der Ermittlung der F^*- Kurve des Präcursorpools verschiedene Halbwertszeiten vorgeben und vom Computer die jeweiligen P^*- Kurven berechnen lassen. Aus diesen Kurven wird für den benutzten Injektionszeitplan der zu erwartende Einbauquotient bestimmt. Aus den vorgegebenen Halbwertszeiten und den ermittelten Einbauquotienten wird eine Eichkurve erstellt, aus der für experimentell gewonnene Einbauquotienten die absoluten Halbwertszeiten abgelesen werden können.

Diese Methode erscheint fragwürdig. Allein die Wahl des richtigen Präcursorpools, welches besonders für diese Anwendung sehr entscheidend sein wird, dürfte zur Zeit nicht möglich sein, da die Aminoacyl-tRNA in der Zelle in

verschiedenen Kompartimenten vorzuliegen scheint (siehe 5.6.). Wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, werden bei Verwendung unterschiedlicher Präcursorpools, deren k_p- Werte sich nur um den Faktor 1,2 unterscheiden, sehr verschiedene Halbwertszeiten ermittelt (siehe Tabelle 18).
Weierhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß die vom Computer errechneten P^*- Kurven nicht dem realistischen Kurvenverlauf der experimentellen Werte entsprechen (siehe Abbildung 23). Besonders der hintere Kurventeil, aus dem die spezifische Radioaktivität für den 1. Puls abgelesen werden müßte, wird von den P^*- Kurven nicht angepaßt, so daß die von ZAK et al. (1977) ermittelte Eichkurve nicht realistisch sein kann.
Aus dem gleichen Grund ist die von ZAK et al. (1977) vorgeschlagene Festlegung des Injektionszeitplanes aus einer P^*- Kurve, die nach Ermittlung der spezifischen Radioaktivität in dem zu untersuchenden Protein aus einem einzigen Pulsmarkierungsexperiment und der bestimmten F^*- Kurve von einem Computer berechnet worden ist, sehr gewagt.

5.6. Zur Problematik des Präcursors

Eine Voraussetzung für die Anpassung der experimentellen Werte der spezifischen Radioaktivität in den Proteinen an theoretische Werte mit dem Computer ist die Ermittlung der spezifischen Radioaktivität im tatsächlichen Präcursorpool. Lange Zeit wurde angenommen, daß das intrazelluläre Aminosäurepool als Präcursor für die Proteinsynthese diene.
Die Verhältnisse sind aber komplexer, so daß man in einem Gewebe zunächst zwischen drei Aminosäurepools unterscheiden muß: extrazelluläres und intrazelluläres Aminosäurepool und das Aminoacyl-tRNA- Pool.
Inzwischen gibt es Arbeiten, die auf eine Kompartimentierung des intrazellulären Aminosäurepools hindeuten (MORTIMORE et al., 1972; KHAIRALLAH und MORTIMORE, 1976)
Die ersten Hinweise stammen bereits von KIPNIS et al.

(1961). Bei Inkubation von Rattenzwerchfell mit ^{14}C- markierten Aminosäuren äquilibrierte das intrazelluläre Aminosäurepool mit dem extrazellulären nach einer exponentiellen Zeitfunktion. Der Einbau der Aminosäuren in die Proteine aber verlief von Anfang an nach einer linearen Zeitfunktion ohne die erwartete "Lag"- Phase. Gefolgert wurde aus diesem Befund, daß das intrazelluläre Aminosäurepool in Bezug auf die Proteinsynthese heterogen ist. Entweder ist das intrazelluläre Aminosäurepool strukturell kompartimentiert in Zellorganellen, die ein wesentlich kleineres Aminosäurepool besitzen als das freie intrazelluläre Pool, oder die Aminosäuren sind chemisch in der Art kompartimentiert, daß Aminosäuren, die zum Zweck der Proteinsynthese in die Zelle gelangen, sofort an die tRNA gekoppelt werden, so daß die freien intrazellulären Aminosäuren gar nicht für die Proteinsynthese in Frage kommen.
Der direkte Präcursor für die Proteinsynthese ist weder das intrazelluläre noch das extrazelluläre Aminosäurepool, sondern in allen Fällen eine Aminoacyl- tRNA. Basierend auf dem Befund, daß die spezifische Radioaktivität einer als Puls verabreichten radioaktiv markierten Aminosäure initial im Aminoacyl- tRNA- Pool kleiner ist als im extrazellulären aber größer als im intrazellulären Aminosäurepool ist

$$F^*_e > F^*_{tRNA} > F^*_i \quad \text{(Gleichung 9)},$$

sprechen einige Arbeiten über eine Mischung der Aminosäuren aus beiden Pools vor der Kopplung an die tRNA (MORTIMORE et al., 1972; KHAIRALLAH und MORTIMORE, 1976) und andere Arbeiten über eine Mischung nach der Kopplung an die tRNA (AIRHART et al., 1974; HOD und HERSHKO, 1976; VIDRICH et al., 1977).
Gemäß der oben genannten Befunde wurden in der vorliegenden Arbeit durch die angewandten Meßmethoden die spezifischen Radioaktivitäten im intrazellulären und extrazellulären Aminosäurepool gemessen, die eine obere und untere Grenze für die spezifische Radioaktivität des tatsächlichen Präcursorpools der drei größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase darstellen sollte. Deshalb ist eine

Berechnung der P^*- Kurven mit dem intrazellulären und dem extrazellulären Aminosäurepool als gute Näherung anzusehen. Das oben aufgestellte Modell (Gleichung 9) scheint jedoch noch eine Vereinfachung darzustellen. ILAN und SINGER (1975) fanden starke Hinweise auf eine Kompartimentierung des intrazellulären Aminoacyl- tRNA- Pools. Aus Wassermolchen isolierten sie noch nicht fertige Proteinketten freier und membrangebundener Ribosomen und bestimmten jeweils die spezifische Radioaktivität des Leucins. Aus dem Befund, daß die spezifische Radioaktivität des Leucins in den von den freien Ribosomen isolierten Ketten doppelt so hoch war wie von den membrangebundenen Ribosomen, schlossen sie, daß letztere mit einem Aminosäurepool in Verbindung stehen, welches doppelt so groß ist wie das Aminosäurepool der freien Ribosomen.
Mehrere F^*_{tRNA}- Pools innerhalb der Grenzen von Gleichung 9 können in dieser Arbeit nicht differenziert werden; wohl aber F^*_{tRNA}- Pools, die weit außerhalb der Grenzen von Gleichung 1 liegen. Innerhalb der Grenzen der Gleichung 9 liegen die Präcursorpools sämtlicher in dieser Arbeit untersuchten Proteine mit Ausnahme der δ- Untereinheit. Die spezifische Radioaktivität des Präcursors für dieses Protein ist scheinbar kleiner als die des intrazellulären Aminosäurepools (siehe 5.8.), so daß die Gleichung 9 noch erweitert werden müßte:

$$F^*_e > F^*_{tRNA(ges.)} > F^*_i > F^{*\delta}.$$

5.7. Computerauswertung der Pulsmarkierungsexperimente

Grundlagen für die Ermittlung der spezifischen Radioaktivität im intrazellulären und extrazellulären Aminosäurepool war die Messung der Leucinkonzentration und Radioaktivität im Serum- und Zellwasser. Die für das Kaninchen bestimmte Leucinkonzentration im Serumwasser von 144 µM ist vergleichbar mit Serumwasserkonzentrationen des Leucins von 140 µM beim Menschen (BOUPART, 1962) und 179 µM bei der Ratte (MARTIN, 1981). Die in dieser Arbeit errechnete

Leucinkonzentration von 221 µM (siehe 4.2.2.) im Intrazellularraum (20,4 % extrazelluläres Volumen im Gastrocnemius der Ratte nach KIPNIS et al., 1959) stimmt sehr gut mit einer Leucinkonzentration von 223 µM im Intrazellularraum des Rattenherzens überein (24,7 % extrazelluläres Volumen, MARTIN, 1981).
In der vorliegenden Arbeit können die zeitlichen Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität in den Aminosäurepools mit einer einfachen Exponentialfunktion angepaßt werden, wobei jedoch der aufsteigende Teil der Kurve, der experimentell nicht ermittelt wurde, nicht erfaßt wird.
Da F^*_e- Kurve um den Faktor 1,2 steiler verläuft als die F^*_i- Kurve (siehe Abbildung 20), sind die vom Computer ermittelten P^*_e- Kurven gegenüber den P^*_i- Kurven nach rechts verschoben (siehe Abbildung 23). Die prozentuale Abweichung der Anpassung von den experimentellen Punkten über den gesamten Kurvenverlauf ist in beiden Fällen identisch (siehe Tabelle 18). Einen möglichen Hinweis, daß das tatsächliche Präcursorpool der drei größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase einen der F^*_i- Kurve ähnlicheren Verlauf ihrer F^*- Kurve besitzt, zeigt die Tatsache, daß die P^*_i- Kurven 0- 8 Tage nach Pulsmarkierung die experimentellen Werte besser anpassen als die P^*_e- Kurven. Abgesehen von den $P^{*\delta}$- Kurven, die mit den beiden Aminosäurepools als Präcursor nicht angepaßt werden konnten (siehe Abbildung 23 und 5.8.), passen die P^*_i- und P^*_e- Kurven die experimentellen Werte im Bereich der Tage 0- 8 recht gut an, wogegen die Anpassung im hinteren Kurventeil (10- 21 Tage) schlecht ist.
Unter der Annahme, daß die F^*- Kurve des tatsächlichen Leucyl- tRNA- Pools auch mit einer einfachen Exponentialfunktion angepaßt werden kann und im Untersuchungszeitraum zwischen den F^*_e- und F^*_i- Kurven verläuft (siehe 5.6.), wäre eine bessere Anpassung der experimentell ermittelten Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den einzelnen Untereinheiten mit einer P^*_{tRNA}- Kurve auch nicht möglich. Diese P^*_{tRNA}- Kurve würde noch zwischen den ohnehin schon sehr ähnlichen P^*_e- und P^*_i- Kurven liegen und damit auch keine bessere Anpassung des hinteren Kurventeils

(10- 21 Tage) bewirken.
Es muß gefolgert werden, daß nach dem hier benutzten mathematischen Modell des Turnovers und einem durch eine einfache Exponentialfunktion beschreibbaren Präcursorpool eine Anpassung der experimentellen Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Proteinen über den gesamten Untersuchungszeitraum nicht möglich ist. Der Kurvenverlauf scheint komplexer zu sein als es die Differentialgleichung (Gleichung 8) beschreibt.
Auch eine differenziertere Anpassung der F^*- Kurve durch eine "three exponential" Funktion (MARTIN et al., 1977) bewirkt keine Anpassung der experimentell ermittelten Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Proteinen nach Pulsmarkierung über den gesamten Untersuchungszeitraum. Dies zeigt die versuchte Computeranpassung des Verlaufes der gemessenen spezifischen Radioaktivität in den schweren Ketten des Myosins der Ratte 0- 14 Tage nach Pulsmarkierung. Mit der oben beschriebenen F^*- Kurve gelingt nur eine befriedigende Anpassung im Bereich 6- 14 Tage nach Pulsmarkierung. Der Kurvenbereich 0- 6 Tage ist unter den dort gewählten Bedingungen schlecht angepaßt (MARTIN et al., 1977).
Um die experimentellen Werte der spezifischen Radioaktivitäten in den Proteinen im gesamten Untersuchungszeitraum mit einer berechneten Kurve anpassen zu können, werden zwei geeignete P^*- Kurven addiert, von der sich die eine nur unwesentlich von den bereits beschriebenen P^*-Kurven der jeweiligen Untereinheit der Phosphorylase Kinase unterscheidet. Der k_p- Wert der zweiten P^*- Kurve beträgt scheinbar für die drei größeren Untereinheiten übereinstimmend $0{,}02\ \text{Tage}^{-1}$ (siehe Tabelle 19). Es ist aber zu vermuten, daß es sich hier um unterschiedliche Werte handelt, deren kleine Differenzen zum Betrag 0,02 bei der hier gewählten Methode der Anpassung (siehe 4.2.9.3.) durch Kurvenzerlegung nicht gesehen werden können.
Für diese Art der Anpassung der experimentellen Werte wurden in allen Fällen jeweils zwei P_i^*- Kurven verwendet (siehe Abbildung 26), da mit diesen eine bessere Anpassung erzielt

werden konnte als mit zwei p_e^*- Kurven.
Die bessere Anpassung der experimentellen Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten der Phosphorylase Kinase durch Addition von zwei unterschiedlichen P^*- Kurven bedeutet, daß die nach den zugrunde gelegten Reinheitskriterien als homogen erscheinenden Untereinheiten (siehe 4.1.1.1.) möglicherweise aus zwei in gleichen Mengen vorhandenen Proteinen mit unterschiedlichen Halbwertszeiten bestehen. Es könnte sich um Isoenzyme handeln, wobei aber das Isoenzym aus dem roten Muskel ausscheidet, da es nur mit 0 bis maximal 6 % in den Präparationen enthalten war.
Ein vergleichbares Phänomen beschreibt KOHAMA (1980). Aktin aus Hühnermuskulatur, welches bei 4° C für 15 Minuten extrahiert worden ist, zeigt einen um den Faktor 1,7 kleineren ^3H- Leucineinbau 20 Stunden nach Pulsmarkierung als Aktin aus der gleichen Muskulatur, das unter sonst gleichen Bedingungen für 2 Stunden bei 25° C extrahiert worden ist. Kohama kann aber nicht ausschließen, daß es sich im zweiten Fall um 10 S Actinin handelt, welches einen höheren Turnover zeigt als das Actin und von letzterem kaum zu unterscheiden ist.

5.8. Erste Hinweise auf verschiedene Präcursorpools für die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase

In der vorliegenden Arbeit sprechen mehrere Hinweise dafür, daß die δ- Untereinheit aus einem anderen Präcursorpool synthetisiert wird als die übrigen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase:
1. Nach der Berechnung der relativen Turnoverraten der Untereinheiten aus den initialen und maximalen Einbauraten ergibt sich für die δ- Untereinheit die niedrigste Turnoverrate. Bei der Berechnung aus den apparenten Degradationskonstanten und dem Doppelmarkierungsexperiment erhält die δ- Untereinheit die höchste relative Turnoverrate (siehe Tabelle 15 und 17).

2. Während die F_e^*- Kurve (und die F_i^*- Kurve, was aber nicht in der Abbildung 22 gezeigt wird) die Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den drei größeren Untereinheiten in der näheren Umgebung des Maximums schneiden, wird die entsprechende Verlaufskurve der α- Untereinheit ca. 11 Tage hinter ihrem Maximum von der F_e^*- Kurve geschnitten (siehe Abbildung 22).
3. Die Computeranpassung der experimentellen Werte der spezifischen Radioaktivität des Leucins in der α- Untereinheit mit der F_i^*- oder der F_e^*- Kurve als Präcursorpool ergibt eine mittlere prozentuale Abweichung der errechneten von der experimentellen Kurve von ca. 70 %, während diese Abweichung bei den anderen drei Untereinheiten nur ca. 17 % beträgt (siehe Abbildung 23 und Tabelle 18). Dagegen lassen sich die experimentellen Werte der α- Untereinheit unter der Annahme eines hypothetischen Präcursorpools ($F_i^{*\prime}$) mit einer mittleren Abweichung von 23 % anpassen (siehe Abbildung 27 A). Unter Verwendung des gleichen Präcursorpools aber einer Anpassung der experimentellen Werte mit zwei P^*- Kurven ist die mittlere prozentuale Abweichung sogar auf 8,9 % reduzierbar (siehe Tabelle 19). Die oben geschilderten Befunde bezüglich des Präcursorpools der α- Untereinheit sind mit den Ergebnissen von ILAN und SINGER (1975) erklärbar. Man könnte spekulieren, daß die drei größeren Untereinheiten der Phosphorylase Kinase von freien Ribosomen synthetisiert werden (kleineres Präcursorpool), während die α- Untereinheit von membrangebundenen Ribosomen (größeres Präcursorpool) synthetisiert wird. Auf diese Weise sind die vermeintlichen Widersprüche bei der Bestimmung der relativen Turnoverraten nach vier verschiedenen Methoden (siehe 4.2.8.) aufgeklärt. Die $F_i^{*\prime}$- Kurve würde dann den zeitlichen Verlauf der spezifischen Radioaktivität des Leucins in dem Präcursorpool, welches die membrangebundenen Ribosomen mit Aminosäuren versorgt, wiedergeben.
In der Literatur wird versucht, ein vergleichbares Phänomen anders zu erklären. Aus der Konvergenz der spezifischen Radioaktivitäten nach Pulsmarkierung in den schweren

und leichten Ketten des Myosins aus Rattenmuskulatur im ansteigenden Teil der Verlaufskurve (10 Minuten bis 4 Tage) folgern ZAK et al. (1977) die Existenz eines cytoplasmatischen Pools an leichten Ketten. Die beschriebene Konvergenz der spezifischen Radioaktivitäten in diesem Kurventeil kann eigentlich nur mit einem initial nicht linearen Verlauf des Einbaus der markierten Aminosäure in die leichten Ketten erklärt werden, was aber im Gegensatz zu den Befunden von KIPNIS et al. (1961) stehen würde. Im Vergleich zu dem Verlauf der spezifischen Radioaktivität in den schweren Ketten könnte diese Verzögerung durchaus durch die Verdünnung der neu synthetisierten, markierten leichten Ketten durch nicht markierte Ketten aus einem cytoplasmatischen Pool erklärt werden. Die Existenz cytoplasmatischer Pools von ribosomalen Proteinen, die von dort zu dem reifen Ribosom transportiert werden, wurden bereits beschrieben (GUPTA et al., 1972; MARVALDI et al., 1974).
Nach der von ZAK et al. (1977) beschriebenen Methode kann die Existenz eines cytoplasmatischen Pools an α- Untereinheiten nicht nachgewiesen werden, da die erste Messung der spezifischen Radioaktivität in diesem Protein erst 0,5 Tage nach Pulsmarkierung erfolgte.
MARTIN (1981) schließt sich in der Interpretation ihrer Turnovermessungen an den Untereinheiten des Troponins und weiteren Proteinen der Rattenmuskulatur ZAK et al. (1977) an. Martin bestimmte relative Turnoverraten aus einem Pulsmarkierungsexperiment im initialen Inkorporationsbereich und durch Infusion von ^{3}H- Leucin. Mit Ausnahme der TNI- Untereinheit des Troponins ermittelte sie nach beiden Bestimmungsmethoden gleiche relative Turnoverraten. Bei der TNI-Untereinheit fand sie nach dem initialen Einbau eine halb so hohe relative Turnoverrate wie nach der Infusionsmethode und schloß aus diesem Ergebnis, daß es ein cytoplasmatisches Pool an TNI- Untereinheiten geben muß. Diese Deutung erscheint etwas vorschnell, da nicht ausgeschlossen worden ist, daß die TNI- Untereinheit vielleicht von einem anderen Präcursorpool synthetisiert wird als die anderen Untereinheiten, eine Entscheidung, die nach den bisher durchgeführten Experimenten nicht getroffen werden kann.

5.9. Turnover und Immunfluoreszenz

Anti α, Anti β und Anti γ enthalten monospezifische, präzipitierende Antikörper , die mit Untereinheiten, die nicht als Immunogen verwandt wurden, keine Kreuzreaktion eingehen (siehe Abbildung 10). Im Anti δ konnten keine präzipitierenden Antikörper nachgewiesen werden, ein Befund, der schon von einer anderen Arbeitsgruppe beschrieben worden ist (DEDMAN et al., 1978). Das Vorhandensein von Antikörpern gegen die gereinigte δ- Untereinheit wurde durch einen Mikro- Komplement- Bindungstest nachgewiesen (VEH et al., 1980).

Aus diesen Tatsachen kann gefolgert werden, daß die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase in entfaltetem Zustand wahrscheinlich keine Sequenzhomologien aufweisen, und daß die Untereinheiten rein sind.

Bei der Diffusion eines Gemisches der isolierten Untereinheiten gegen Anti α, Anti β und Anti γ traten Reaktionen "partieller Identität" (CROWL, 1975), sogenanntes "Spurring" auf (siehe Abbildung 34). Erwartet wurden Reaktionen von "nicht Identität". Da das Vorhandensein von Sequenzhomologien auf Grund der Versuche in Abbildung 10 sehr unwahrscheinlich ist, könnte das Auftreten der Reaktion partieller Identität darauf zurückzuführen sein, daß die getrennten Untereinheiten in dem Diffusionspuffer mit 1 % Triton-X 100 mehr oder weniger stark reassoziieren. Es würden in den Präzipitationslinien somit nicht z.B. ein Anti α-α Komplex oder ein Anti β-β Komplex vorliegen, sondern ein Anti α-αβ oder ein Anti β-βα Komplex. Für diese Interpretation spricht auch, daß die verschiedenen präzipitierenden Antiseren eine Reaktion der Identität mit dem nativen Holoenzym eingehen (siehe Abbildung 35).

Aus den Immunfluoreszenzbildern (siehe Abbildung 38) kann geschlossen werden, daß die Untereinheiten der Phosphorylase Kinase in mindestens einem extrazellulären und wenigstens zwei intrazellulären Kompartimenten der Muskelzelle vorkommen. Alle 4 Antikörper gegen die einzelnen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase und auch Anti- Phosphory-

lase b färben die Ränder der Cohnheim'schen Felder in einem Muskelquerschnitt an (siehe Abbildung 40). Eine Anfärbung des Glycogens der Muskelzelle mit einer PAS- Reaktion ergibt ein identisches Färbemuster. Da die Ränder der Cohnheim'schen Felder in der Verteilung identisch mit der Verteilung des sarkoplasmatischen Retikulum sind, wie auch die Immunfluoreszenz mit Anti- ATPase beweist (Abbildung nicht gezeigt), liegt die Vermutung nahe, daß die Phosphorylase Kinase, die Phosphorylase b und das Glycogen in unmittelbarer Nähe des sarkoplasmatischen Retikulum lokalisiert sind. Biochemisch wird diese These gestützt durch den Befund, daß die Phosphorylase Kinase in Gegenwart von 10 µM Ca^{2+} und Glycogen an das sarkoplasmatische Retikulum gebunden wird (JENNISSEN und LAHR, 1980).

Im Falle der Untereinheiten α und δ ist die Frage der Lokalisation noch komplexer. FITC- Anti α färbt nach den bisherigen Befunden die Basalmembran des Sarkolemms an (siehe Abbildung 39). Möglicherweise ist ein Polypeptid mit einer der α- Untereinheit ähnlicher oder identischer Struktur extrazellulär lokalisiert.

FITC- Anti δ färbt ebenfalls sehr schwach das Sarkolemm an (siehe Abbildung 38). Da diese Antikörper aber weder die Zellgrenzen der glatten Muskulatur noch die Basalmembran unterhalb des Epithels anfärben (siehe Abbildung 39), muß das Antigen in der Plasmamembran lokalisiert sein. Dieser Befund ist auch deshalb naheliegend, da das Modulatorprotein mit Zellmembranen funktionell im Zusammenhang zu stehen scheint (SCHULMANN und GREENGARD, 1978).

Nach dem Befund eines heterologen Turnovers für die vier Untereinheiten der Phosphorylase Kinase scheint die Möglichkeit einer differentiellen Lokalisation der Untereinheiten im Muskelgewebe durchaus gegeben.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird mit Hilfe von Pulsmarkierungsexperimenten gezeigt, daß die vier heterologen Untereinheiten der Phosphorylase Kinase, einer Ca^{2+} abhängigen, Calmodulin-regulierten Proteinkinase, einen unterschiedlichen Turnover besitzten, und daß die δ- Untereinheit möglicherweise aus einem anderen Präcursorpool synthetisiert wird als die anderen Untereinheiten α, β und γ.
Die Turnovermessungen werden durch Doppelmarkierung und einer Serie von Einfachmarkierungen durchgeführt, von denen letztere nach folgenden vier voneinander unabhängigen Methoden ausgewertet werden: 1. initialer Einbau, 2. maximaler Einbau, 3. apparente Degradationskonstanten, 4. Computeranpassung der Verlaufskurven der spezifischen Radioaktivität des Leucins in den Untereinheiten.
Voraussetzung für diese Messungen war die präparative Isolierung der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase und des Leucins aus Serum und Muskelrohextrakt.
Geordnet nach der Höhe ihrer relativen Turnoverraten ergibt sich schließlich folgende Reihenfolge der Polypeptide:
$\delta > \gamma > \alpha > \beta$.
Aus der Diskrepanz in der Höhe der relativen Turnoverraten nach der Methode des initialen und maximalen Einbaus ($\gamma > \alpha > \beta > \delta$) gegenüber den berechneten relativen Turnoverraten aus den apparenten Degradationskonstanten und dem Doppelmarkierungsexperiment ($\delta > \gamma > \alpha > \beta$) wird auf die Synthese der δ- Untereinheit aus einem anderen Präcursorpool geschlossen. Durch die Möglichkeit einer besseren Anpassung der experimentell ermittelten spezifischen Radioaktivitäten des Leucins in der δ- Untereinheit durch den Computer mit Hilfe eines hypothetischen Präcursorpools wird der Verdacht auf die Synthese aus einem anderen Präcursorpool erhärtet.
Je nach Auswertungsmethode am Computer lassen sich folgende obere und untere Grenzen für die Halbwertszeiten der Untereinheiten berechnen: α 1,6- 2,9 Tage, β 1,7- 3,3 Tage,

γ 1,3- 2,4 Tage und δ 0,4 Tage.
Durch Immunisierung von Schafen mit den isolierten Untereinheiten der Phosphorylase Kinase wurden monospezifische Antikörper gewonnen (keine Kreuzreaktion mit Untereinheiten, die nicht als Immunogen verwendet wurden).
Lokalisationsexperimente mit diesen Antikörpern nach FITC-Markierung zeigen übereinstimmend bei den vier verschiedenen Antikörpern eine Anfärbung der Ränder der Cohnheim'schen Felder. Zusätzlich färben Anti α und Anti δ das Sarkolemm der quergestreiften Muskelzelle an.
Dieses möglicherweise vom Holoenzym isolierte Vorkommen der Untereinheiten α und δ kann mit dem heterologen Turnover der Untereinheiten der Phosphorylase Kinase erklärt werden.

7. Literaturverzeichnis

Airhart, J., Vidrich, A. und Khairallah, E.A. (1974)
Biochem. J. 140, 539

Arias, I.M., Doyle, D. und Schimke, R.T. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 3303

Autric, F., Concepcion, S., Kilhoffer, M.C., Cavadore, J.C. und DeMaille, J.G. (1980)
Biochim. Biophys. Acta 631, 139

Beattie, D.S., Basford, R.E. und Koritz, S.B. (1967)
J. Biol. Chem. 242, 4584

Bloom, W. und Fawcett, D.W. (1975)
Textbook of Histology, 10th Ed., p. 298, Sauders Co. Philadelphia

Bohley, P., Kischke, H., Langner, J., Wiederanders, B., Ansorge, S. und Hanson, S. (1977)
in: Intracellular Protein Catabolism II (Turk, V. und Marks, N., Hrsg.), S. 108, Plenum, New York - London

Bond, J.S. (1971)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 333

Borsook, H. und Keighley, G.L. (1936)
Proc. Roy. Soc. 118, 488

Brostrom, C.O., Hunkeler, F.L. und Krebs, E.G. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 1961

Butler, P.J.G., Harris, J.I., Hartley, B.S. und Leberman, R. (1969)
Biochem. J. 112, 679

Caudwell, B., Antoniw, J.F. und Cohen, P. (1987)
Eur. J. Biochem. 86, 511

Chervenka, C.H. (1969)
in: A Manual of Methods for the Analytical Ultracentrifuge, Spinco Div. of Beckmann Instruments Inc. Palo Alto (California)

Cheung, W.Y. (1980)
Science 207, 19

Clotten, R. und Clotten, A. (1962)
Hochspannungselektrophorese, Thieme Verlag, Stuttgart

Cohen, P. (1973)
Eur. J. Biochem. 34, 1

Cohen, P., Burchell, A., Foulkes, J.G., Cohen, P.T.W., Vanaman, T.C. und Nairn, A.C. (1978)
FEBS Lett. 92, 287

Cohen, P., Duewer, T. und Fischer, E.H. (1971)
Biochemistry 10, 2683

Cohn, E.J. und Edsall, J.T. (1943)
in: Proteins, Aminoacids and Peptides (Cohn, E.J. und Edsall, J.T., Hrsg.), S. 360, Reinhold Publishing Corp., New York

Cori, G.T., Slein, M.W. und Cori, C.F. (1948)
J. Biol. Chem. 173, 605

Crowl, A.J. (1975)
in: Methods in Protein Separation (Catsimpooas, N., Hrsg.) Vol. 1, S. 69, Plenum Press, New York - London

Cuatrecasas, P. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 3059

David, H.A., Hartley, H.O. und Pearson, E.S. (1954)
Biometrika 41, 482

Dayton, W.R., Reville, W.J., Goll, D.E. und Stromer, M.H. (1976)
Biochemistry 15, 2159

Dedman, J.R., Welsh, M.J. und Means, A.R. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 7515

De Lange, R.J., Kemp, R.G., Riley, W.D., Cooper, R.A. und Krebs, E.G. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 2200

DeMeis, L. und Hasselbach, W. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 4759

Dice, J.F., Dehlinger, P.J. und Schimke, R.T. (1973)
J. Biol. Chem. 248, 4220

Dice, J.F. und Goldberg, A.L. (1976)
Nature 262, 514

Dice, J.F. und Schimke, R.T. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 98

Dickneite, G., Jennissen, H.P. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1978)
FEBS Lett. 87, 297

Dölken, G. und Pette, D. (1974)
Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 355, 289

Drummond, G.I., Harwood, J.R. und Powell, C.R. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4235

Ellman, G.L. (1958)
Arch. Biochem. Biophys. 74, 443

Ellman, G.L. (1959)
Arch. Biochem. Biophys. 82. 70

Fischer, E.H., Becker, J.U., Blum, H.E., Byers, B., Heizmann, C., Gerrick, G.W., Lehky, P., Malencik, D.A. und Pocinwong, S. (1976)
in: Molecular Basis of Motility (26. Colloquium- Mosbach 1975), (Heilmeyer Jr., L.M.G., Rüegg, J.C. und Wieland, T., Hrsg.), S. 137, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York

Fischer, E.H., Heilmeyer Jr., L.M.G. und Haschke, R.H. (1971)
in: Current Topics in Cellular Regulation 4 (Horecker, B.L. und Stadtman, E.R., Hrsg.), S. 211, Academic Press, New York - San Francisco - London

Fischer, E.H. und Krebs, E.G. (1958)
J. Biol. Chem. 231, 65

Fiske, C.H. und Subba'row, Y. (1925)
J. Biol. Chem. 66, 375

Fulks, R.M., Li, J.B. und Goldberg, A.L. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 290

Gear, A.R.L. und Schneider, W. (1975)
Biochim. Biophys. Acta 392, 111

Goldberg, A.L. (1972)
in: Muscle Biology (Cassens, R.G., Hrsg.) Vol. 1, S. 89, Marcel Dekker, New York

Godeau, J.F., Beuzard, Y.G., Cacheleux, J., Brizard, A.G. und Rosa, J. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4346

Grand, R.J.A., Shenolikar, S. und Cohen, P. (1981)
Eur. J. Biochem. 113, 359

Gröschel- Stewart, U. (1971)
Biochim. Biophys. Acta 229, 322

Gröschel- Stewart, U., Jennissen, H.P., Heilmeyer Jr., L.M.G. und Varsanyi, M. (1978)
Int. J. Peptide Protein Res. 12, 177

Gupta, R.S. und Singh, U.N. (1972)
J. Mol. Biol. 69, 279

Handbook of Chemistry ans Physics, 52nd ed. (1971- 72)
(Weast, R.C., Hrsg.) Chemical Rubber Co., Cleveland (Ohio)

Harris, J.I. und Perham, R.N. (1965)
J. Mol. Biol. 13, 876

Haschke, R.H. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1972)
Anal. Biochem. 47, 451

Hasselbach, W. (1966)
Ann. N. Y. Acad. Sci. 137, 1041

Hasselbach, W. (1979)
in: Topics in Current Chemistry 78 (Boscke, F.L., Hrsg.)
S. 1, Springer Verlag Berlin - Heidelberg - New York

Hayakawa, T., Perkins, J.P. und Krebs, E.G. (1973)
Biochemistry 12, 574

Hayakawa, T., Perkins, J., Walsh, D.A. und Krebs, E.G. (1973)
Biochemistry 12, 567

Heilmeyer Jr., L.M.G., Meyer, F., Haschke, R.H. und
Fischer, E.H. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 6649

Heimberg, M. und Velick, S.F. (1954)
J. Biol. Chem. 208, 725

Hod, Y. und Hershko, A. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4458

Hörl, W.H., Jennissen, H.P. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1978)
Biochemistry 17, 759

Hörl, W.H., Jennissen, H.P. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1978)
Biochemistry 17, 766

Holroyde, M.J., Robertson, S.P., Johnson, J.D., Solaro, R.J.
und Potter, J.D. (1980)
J. Biol. Chem. 255, 11688

Ilan, J. und Singer, M. (1975)
J. Mol. Biol. 91, 39

Jahnke, U. (1981)
Dissertation, Abteilung für Chemie, Ruhr- Universität Bochum

Jarzebinski, J. und Rolski, S. (1969)
Farm. Pol. 4, 271

Jennissen, H.P. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1974)
Anal. Biochem. 57, 118

Jennissen, H.P. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1974)
FEBS Lett. 42, 77

Jennissen, H.P. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1975)
Biochemistry 14, 754

Jennissen, H.P., Hörl, W.H., Gröschel- Stewart, U., Velick, S.F. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1975)
in: Metabolic Interconversion of Enzymes (Shaltiel, S., Hrsg.), S. 19, Springer Verlag, Berlin - Heidelberg - New York

Jennissen, H.P. und Lahr, P. (1980)
FEBS Lett. 121, 143

Johnson. L.W. und Velicl, S.F. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 4138

Khairallah, E.A. und Mortimore, G.E. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 1375

Kipnis, D.M., Helmreich, E. und Cori, C.F. (1959)
J. Biol. Chem. 234, 165

Kipnis, D.M., Reiss, E. und Helmreich, E. (1961)
Biochim. Biophys. Acta 51, 519

Kohama, K. (1980)
J. Biochem. 87, 997

Koizumi, T. (1974)
J. Biochem. (Tokyo) 76, 431

Krebs, E.G. und Fischer, E.H. (1956)
Biochim. Biophys. Acta 20, 150

Krebs, E.G., Kent, A.B. und Fischer. E.H. (1958)
J. Biol. Chem. 231, 73

Lebherz, H.G. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 7388

Low, R.B. und Goldberg, A.L. (1973)
J. Cell. Biol. 56, 590

Lowry, O.H., Rosebrough, N.I., Farr, A.L. und Randall, R.J. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265

MacLennan, D.H. und Holland, P.C. (1975)
Annu. Rev. Biophys. Bioeng. 4, 377

MacLennan, D.H., Yip, C.C., Iles, G.H. und Seeman, P. (1973)
Cold Spring Habor Symp. Quant. Biol. 37, 469

MacLennan, D.H. und Wong, P.T.S. (1971)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 68, 1231

Manchester, K.L. (1970)
in: Mammalian Protein Metabolism (Munro, H.N. und Allison, J.B., Hrsg.) Vol. 4, S. 229, Academic Press, New York

Martin, A.F. (1981)
J. Biol. Chem. 256, 964

Martin, A.F., Rabinowitz, M., Blough, R., Prior, G. und Zak, R. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 3422

Martonosi, A. (1971)
Biomembranes (Mauron, L.A., Hrsg.), Vol. 1, S. 191

Marvaldi, J., Pichon, J., Delaage, M. und Marchis- Mauren, G. (1974)
J. Mol. Biol. 84, 83

Matusiak, R. und Karolak, M. (1970)
Farm. Pol. 1, 47

McFarland, B.H. und Inesi, G. (1971)
Arch. Biochem. Biophys. 145, 456

McFarlane, A.S. (1952)
Brit. Med. J. 8, 213

McLendon, G. und Radnay, E. (1978)
J. Biol. Chem. 253, 6335

Mortimore, G.E. und Mondon, C.E. (1970)
J. Biol. Chem. 245, 2375

Mortimore, G.E., Woodside, K.H. und Henry, J.E. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 2776

Munro, H.N. (1964)
in: Mammalian Protein Metabolism (Munro, H.N. und Allison, J.B., Hrsg.) Vol. 1, S. 382, Academic Press New York

Neville Jr., D.M. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 6328

Nimmo, H.G., Pound, C.G. und Cohen, P. (1976)
Eur. J. Biochem. 68, 21

Ouchterlony, Ö. (1949)
Lancet 2, 346

Ozawa, E. (1972)
J. Biochem. (Tokyo) 71, 321

Peachey, L.D. (1965)
J. Cell Biol. 25, 209

Penke, B., Ferenczi, R. und Kavacs, K. (1974)
Anal. Biochem. 60, 45

Perry, S.V. und Cole, H.A. (1973)
Biochem. J. 131, 425

Perry, S.V. und Cole, H.A. (1974)
Biochem. J. 141, 733

Pette, D. (1975)
Acta Histochemica, Suppl. Bd. XIV, 47

Picton, C., Klee, C.B. und Cohen, P. (1980)
Eur. J. Biochem. 111, 553

Porzio, M.A. und Pearson, A.M. (1977)
Biochim. Biophys. Acta 490, 27

Reddy, M.K., Etlinger, J.D., Rabinowitz, M., Fischman, D.A. und Zak, R. (1975)
J. Biol. Chem. 250, 4278

Regier, C.J. und Kafatos, F.C. (1971)
J. Biol. Chem. 246, 6480

Schapira, G., Kruh, J., Dreyfus, J.C. und Schapira, F. (1960)
J. Biol. Chem. 235, 1738

Schlender, K.K., Wei, S.H. und Villar'palasi, C. (1969)
Biochim. Biophys. Acta 191, 272

Schoenheimer, R., Ratner, S. Rittenberg, D.J. (1939)
J. Biol. Chem. 130, 703

Schulman, H. und Greengard, P. (1978)
Nature (London) 271, 478

Segal, L.S., Rothstein, D.M. und Winkler, R.W. (1976)
Biochem. Biophys. Res. Commun. 73, 79

Shenolikar, S., Cohen, P.T.W., Cohen P., Nairn, A.C. und Perry, S.V. (1979)
Eur. J. Biochem. 100, 329

Simpson, M.V. (1955)
J. Biol. Chem. 216, 179

Simpson, M.V. und Velick, S.V. (1954)
J. Biol. Chem. 208, 61

Skuster, J.R. und Graves, D.J. (1977)
11th FEBS Meeting, Copenhagen 1977, Abstract A1-6 0603/4

Soupart, P. (1962)
in: Aminoacid Pools (Holden, J.T., Hrsg.), S. 220, Elsevier, Amsterdam

Steffen, C. (1968)
Allgemeine und experimentelle Immunologie und Immunpathologie, Thieme Verlag, Stuttgart

Sternberger, L.A. (1974)
Immunocytochemistry, Prentice - Hall, Inc., New Jersey

Stull, T.J., Brostrom, C.O. und Krebs, E.G. (1972)
J. Biol. Chem. 247, 5272

Swick, R.W. und Handa, D.T. (1956)
J. Biol. Chem. 218, 577

Swick, R.W., Rexroth, A.K. und Stange, J.L. (1968)
J. Biol. Chem. 243, 3581

Thomas, J.A., Schlender, K.K. und Larner, J. (1968)
Anal. Biochem. 25, 486

Titani, K., Koide, A., Hermann, J., Ericsson, L.H., Kumar, S., Wade, R.D., Walsh, K.A., Neurath, H. unf Fischer, E.H. (1977)
Proc. Natl. Acad Sci. USA 74, 4762

Varsanyi, M. und Heilmeyer Jr., L.M.G. (1979)
FEBS Lett. 103, 85

Veh, R.W., Mehnert, F.E., Petersen, J.K.H. und Jennissen, H.P. (1980)
Hoppe- Seyler's Z. Physiol. Chem. 361, 342

Velick, S.F. (1956)
Biochim. Biophys. Acta 20, 228

Vidrich, A., Airhart, J., Bruno, M.K. und Khairallah, E.A. (1977)
Biochem. J. 162, 257

Walsh, D.A., Perkins, J.P., Brostrom, E.S. und Krebs, E.G. (1971)
J. Biol. Chem.246, 1968

Wang, J.H., Stull, J.T., Huang, T.S. und Krebs, E.G. (1976)
J. Biol. Chem. 251, 4521

Weber, K. und Osborn, M. (1969)
J. Biol. Chem. 244, 4406

Wells et al., (1968)
in: Fluorescent Antibody Methods (Goldmann, M., Hrsg.)
Academic Press, New York

Wikman- Coffelt, J., Zelis, R., Fenner, C.und Mason, D.T.
(1973)
J. Biol. Chem. 248, 5206

Wilcoxon, F. (1949)
Some rapid approximate statistical Procedures, S. 13,
American Cyanamid Company, New York

Zak, R., Martin, A.F. und Blough, R. (1979)
Physiol. Rev. 59, 407

Zak, R., Martin, A.F., Prior, G. und Rabinowitz, M. (1977)
J. Biol. Chem. 252, 3430

Zilversmit, D.B. (1960)
Am. J. Med. 29, 832

Zilversmit, D.B., Enteman, C. und Fischler, M.C. (1943)
J. Gen. Physiol. 26, 325

8. Anhang (Texte der FORTRAN- Programme)

8.1. PROGRAMM I

```
#DRPROTOKOLL
 1 ZUSTAND        = EIN
#DAUSGABE
 1 DATEI          = JZ

START DAUSGABE (14,11)

INHALT DER DATEI JZ (0001.00) IN DATENBASIS ESTD03

      C      PROGRAM UZ
             WRITE(9,2000)
             READ(8,1000) IND
             IF(IND.EQ.2) GOTO 2001
             CALL SUZIE
             GOTO 1002
        2001 CALL GLAN
        1002 CONTINUE
        1000 FORMAT(8)
        2000 FORMAT(X,'FUER SHLAUF GIB 1 AN, FUER GLAUF 2',/)
             STOP'.....UND SIE BEWEGT SICH DOCH !'
             END
             SUBROUTINE SUZIE
             DIMENSION R(20),P(20),PA(20),F(20),XP(20)
            -,SL(20),S(20),BAS(20)
             WRITE(4,10)
          10 FORMAT(X,'ANZAHL DER MESSUNGEN,OMEGA IN UPM,DELTA T IN MIN'
             READ(8,20) N,W,T
             WRITE(4,16)N,W,T
             WRITE(4,11)
          16 FORMAT(11X,I4,10X,F8.1,10X,F4.1,//)
          11 FORMAT(X,'REFERENZ- UND PEAKABSTAENDE',/)
             READ(8,21)(R(I),P(I), I=1,N)
             WRITE(4,17)(R(I),P(I),I=1,N)
          20 FORMAT(3B)
          17 FORMAT(2X,F6.2,10X,F6.2)
          21 FORMAT(2B)
             DO 30 I=1,N
             F(I)=1.62/R(I)
             PA(I)=F(I)*P(I)+5.7
          30 CONTINUE
             TA=T*60.0
             WA=W*6.283/60.0
             WQ=WA**2
             DO 31 I=1,N
          31 XP(I)=ALOG(PA(I))
             SL(1)=0.0
             S(1)=0.0
             DO 32 I=2,N
             SL(I)=(XP(I)-XP(I-1))/TA
          32 S(I)=SL(I)/WQ*1.0E+13
```

```
00044.          WRITE(4,12)
00045.       12 FORMAT(3/,3X,'      ',3X,'PEAK',3X,'LH PEAK',5X,'SLOPE',7X,'S',
00046          -/,3X,3X,'IN CM',16X,'IN CM/S'//)
00047.          WRITE(4,13) BA(1),XP(1)
00048.          WRITE(4,13)(      BA(I),XP(I),SL(I),S(I), I=2,N)
00049.       13 FORMAT(3X,7X,  F8.3,2X,F10.5,3X,E10.3,F8.3)
00050.          SP=0.0
00051.          DO 33 I=1,N
00052.       33 SP=SP+S(I)
00053.          SW=SP/(N-1)
00054.          QP=0.0
00055.          DO 34 I=2,N
00056.       34 QP=QP+(S(I)-SW)**2
00057.          STW=SQRT(QP/(N-2))
00058.          VK=STW/SW
00059.          WRITE(4,14) SW,STW,VK
00060.       14 FORMAT(3X,'ARMITTELTER S-WERT',F8.3,3X,'STDW.',F8.3,
00061.          -3X,'VK',F6.3,/)
00062.C         BERECHNUNG DER AUSGLEICHSGERADEN
00063.          DO 35 I=1,N
00064.       35 BAS(I)=BA*I
00065.          STX=0.0
00066.          SB=0.0
00067.          SX=0.0
00068.          SQX=0.0
00069.          DO 36 I=1,N
00070.          STX=STX+BAS(I)*XP(I)*N
00071.          SB=SB+BAS(I)
00072.          SX=SX+XP(I)
00073.       36 SQX=SQX+N*BAS(I)**2
00074.          SLA=(STX-SB*SX)/(SQX-SB*SB)
00075.          ASS=(SX-SLA*SB)/N
00076.          DQX=0.0
00077.          DO 50 I=1,N
00078.       50 DQX=(XP(I)+SLA*BAS(I)-ASS)**2
00079.          DQX=DQX/(N-2)
00080.          STDA=SQRT(DQX*N/(SQX-SB**2))
00081.          STDA=STDA*1.0E+13/N
00082.          SA=SLA/DQ*1.0E+13
00083.          WRITE(4,15) SLA,SA,STDA
00084.       15 FORMAT(3/,'NACH AUSGLEICHSGERADE BETRAEGT DER SLOPE '
00085.          -,E10.3,' IN CM/S',//,3X,'DER S-WERT',F8.3,' +- ',E9.3,///)
00086.          RETURN
00087.          END
00088.          SUBROUTINE GRAN
00089.          DIMENSION BA(50),R(50),E(50),ER(50),NX(2),LGE(50),IKK(2)
00090.          DOUBLE PRECISION ERR
00091.          REAL LGE,LE
00092.          COMMON/INT/BA(50),N,ERR(2),LE(2)
00093.          WRITE(9,200)
00094.      200 FORMAT(3/,'GIB ANZAHL DER MESSPUNKTE AN!')
00095.          READ(8,101) N
00096.          WRITE(9,800)
00097.      800 FORMAT(3/,'GIB AUSGEMESSENES R UND E AN',//)
00098.          READ(8,102) (R(I), E(I), I=1,N)
00099.          WRITE(9,400)
```

```
 400 FORMAT(X,'GIB WERTE FUER E=0.2 BIS E=1.0 UND D. REF.STRECKE A
     READ(3,103) EG2,EG4,EG6,EG8,EG10,F
     WRITE(4,201)
 101 FORMAT(I3)
 102 FORMAT(2B)
 103 FORMAT(6B)
 201 FORMAT(//X,'NR',4X,'RADIUS',2X,'R**2',4X,' E ',7X,'LGE')
 202 FORMAT(X,I2,4X,F5.3,2X,F5.2,3X,F5.3,3X,F3.5)
 300 FORMAT(/X,'STEIGUNG',I2,' = ',F5.3,3X,'ERD-50 = ',D10.3)
 320 FORMAT(//X,'ANZAHL ITERATIONEN FUER N1= ',I5,'  FUER N2=',I6,
    *'HOCHMOLEKULARE BESTANDTEILE :',F5.1,' PROZENT',///)
 450 FORMAT(/1X,'NAECHSTER ZYKLUS=0, STOP=1',/)
     DO 11 I=1,N
     RA(I)=R(I)*1.62/F+5.7
     RQ(I)=RA(I)**2
     IF (E(I)-EG2) 21,22,23
  21 E(I)=0.2*E(I)/EG2
  22 GOTO 80
  23 IF (E(I)-EG4) 31,32,33
  31 E(I)=0.2*(E(I)-EG2)/(EG4-EG2)+0.2
  32 GOTO 80
  33 IF (E(I)-EG6) 41,42,43
  41 E(I)=0.2*(E(I)-EG4)/(EG6-EG4)+0.4
  42 GOTO 80
  43 IF (E(I)-EG8) 51,52,53
  51 E(I)=0.2*(E(I)-EG6)/(EG8-EG6)+0.6
  52 GOTO 80
  53 E(I)=0.2*(E(I)-EG8)/(EG10-EG8)+0.8
  80 LGE(I)=ALOG(E(I))
     WRITE(4,202) I,RA(I),RQ(I),E(I),LGE(I)
  11 CONTINUE
C    BEGINN DER YPHANTIS-AUSWERTUNG
     AN=N
     IN=INT(AN/3)
 185 IZ=N-IN
     NZ=N
     K=1
     IA=1
     IB=IN
 180 YLE=0
     XRQ=0
     XY=0
     XRQQ=0
     DO 181 I=IA,IB
     YLE=YLE+LGE(I)
     XRQ=XRQ+RQ(I)
     XY=XY+LGE(I)*RQ(I)
 181 XRQQ=XRQQ+RQ(I)**2
     HLE(K)=(XRQ*YLE-(IB-IA+1)*XY)/(XRQ**2-(IB-IA+1)*XRQQ)
     ORDINT=(YLE-HLE(K)*XRQ)/(IB-IA+1)
     ERD(K)=EXP(50*HLE(K)+ORDINT)
     WRITE(4,300) K,HLE(K),ERD(K)
     DO 191 I=IZ,NZ
     ER(I)=ERD(K)*EXP(HLE(K)*(RQ(I)-50))
     DE=E(I)-ER(I)
     IF(DE.LE.0) DE=1E-12
```

```
01560      191 LGE(I)=ALOG(DE)
01570          IF(K.EQ.2) GOTO 195
01580          K=2
01590          IA=IZ
01600          IB=NZ
01610          IZ=1
01620          NZ=IN
01630          GOTO 190
01640      195 IF(MLE(2).GT.MLE(1)) GOTO 196
01650          RETURN
01660      196 WRITE(9,450)
01670          READ(8,101)IX
01680          IF(IX.NE.0) GOTO 197
01690          GOTO 135
01700      197 DO 198 K=1,2
01710          CALL INTER(K,W,NK)
01720          WX(K)=W
01730      198 NKK(K)=NK
01740          WZ=WX(2)/(WX(2)+WX(1))*100
01750          WRITE(4,320)(NKK(K),K=1,2),WZ
01760          RETURN
01770          END
01780          SUBROUTINE INTER(J,WJ,NJ)
01790          REAL MLE
01800          DOUBLE PRECISION ERD(2)
01810          COMMON/INT/RA(50),N,ERD,MLE(2)
01820          NJ=N-1
01830          DR=(RA(N)-RA(1))/(N-1)
01840      400 WJ=0
01850          WU=0
01860          DO 410 I=1,NJ
01870          WJ=WJ+ERD(J)*EXP(MLE(J)*((RA(1)+(I-1)*DR)**2-50))*DR
01880      410 WU=WU+ERD(J)*EXP(MLE(J)*((RA(1)+I*DR)**2-50))*DR
01890          WK=2*(WJ-WU)/(WJ+WU)
01900          IF(WK.LE.0.001) GOTO 420
01910          IF(NJ.GT.9999) GOTO 430
01920          DR=DR/2
01930          NJ=2*NJ
01940          GOTO 400
01950      430 WRITE(4,500) NJ,WK
01960      420 CONTINUE
01970      500 FORMAT(/X,'ITERATION NACH',I5,' SCHRITTEN ABGEBROCHEN',/X,
01980     *'GENAUIGKEIT DER INTEGRATION',E10.3,//)
01990          RETURN
02000          END

ENDE DAUSGABE (14.11) 0.86
```

8.2. PROGRAMM II

```
C*******************************************************************
C           HAUPTPROGRAMM
C*******************************************************************
C********VERFASSER: R.J. SUCHTH 1981
      COMMON/BL1/T(200)
      COMMON/FITCO/IMAX,Y(200),P(200),NX,NX5,NXL,X(15),FUWE,ABL(1
     ,,NB,NB6,NBL,NFI,Q,FX(15),FFV(5),NAJ
      EXTERNAL EX4,EBED,EBED1
      READ(5,10) IMAX,NX,NTEST,NXL,NX6,NB5,NB,NBL,NFI,NZ
   10 FORMAT(20B)
      DO 30 I=1,IMAX
   30 READ(5,10) T(I),Y(I)
      DO 20 I=1,IMAX
   20 P(I)=1.0
      DO 21 I=1,15
   21 X(I)=0.0
      READ(5,10) (X(I),I=1,NX)
      CALL SQUFIT(EX4,EBED,EBED1,NTEST)
      DO 40 I=1,IMAX
      CALL EX4(I)
   40 WRITE(4,50) T(I),Y(I),FUWE
   50 FORMAT(X,3E10.5)
      WRITE(4,60) NAUS
   60 FORMAT(3,10 A)
      STOP
      END
C*******************************************************************
      SUBROUTINE EX4(I)
      COMMON/BL1/T(200)
      COMMON/FITCO/IMAX,Y(200),P(200),NX,NX5,NXL,X(15),FUWE,ABL(15
     ,,NB,NB6,NBL,NFI,Q,FX(15),FFV(5),NAJ
      U=T(I)
      ABL(1)=EXP(X(2)*U)
      ABL(2)=X(1)*U*ABL(1)
      ABL(3)=1.
      ABL(4)=U
      ABL(5)=U**2
      ABL(6)=2*X(6)*EXP(X(7)*U)
      ABL(7)=X(6)**2*U*EXP(X(7)*U)
      FUWE=X(1)*EXP(X(2)*U)+X(3)+X(4)*U+X(5)*U**2
     ++X(6)**2*EXP(X(7)*U)
      RETURN
      END
C*******************************************************************
      SUBROUTINE EBED
      RETURN
      END
      SUBROUTINE EBED1
      RETURN
      END
C*******************************************************************
```

8.3. PROGRAMM III

```
      SUBROUTINE FUNCT(N,XW,F)
C*****************************************************************
      LOGICAL DERIVL
      COMMON/FITCO/FA(100),T(200),PDL(30),IT,M,IK,X(10),XXX,FUNE
     ,,IVAR,DX5,IER,PET(100),C(4),FACT1,IPET
      DIMENSION XW(20)
      F=0.0
      DO 10 I=1,N
      AB=0.0
      DO 30 K=1,NX
      CALL SHEFKT(I,XW(K),H)
   30 AB=AB-FUNE
   10 F=F+(FA(I)-AB)**2*PI(I)
      WRITE(6,20) F,(XW(K),K=1,NX)
   20 FORMAT(' ','HIER',2E14.7)
      IF(IPET.NE.0) STOP'IPET'
      RETURN
      END
C*****************************************************************
      SUBROUTINE FUN
C*****************************************************************
      EXTERNAL FUNCT
      LOGICAL MB
      COMMON/FITCO/FA(100),T(200),PDL(30),IT,M,IK,X(10),XXX,FUNE,IVAR
     ,,DX5
      DIMENSION DX(20),DXS(20),XQ(20),XS(20),XSS(20),G(21),VT(20,21)
      DO 10 I=1,NX
   10 DX(I)=DX5
      WRITE(4,30) (DX(I),I=1,NX)
   30 FORMAT(' ','DX',10E10.4)
      ALPHA=1
      BETA=0.5
      GAMMA=2.
      MB=.FALSE.
      EPS=0.001
      EPS1=2.E-05
      ICYC=3
      STEP=0.001
      N=NX+1
      IF(IVAR.EQ.0)
     ,CALL HJMB2(NX,N,X,FUNCT,DX,ALPHA,BETA,GAMMA,EPS,DXS,XQ,XS,XSS
     ,,G,VT,FF,IRF,KENN)
      IF(IVAR.EQ.1)
     ,CALL ROSIN2(NX,X,FUNCT,MB,EPS1,STEP,ICYC,FF,IRF,KENN)
      WRITE(4,20) (X(J),J=1,NX)
   20 FORMAT(1H ,'MIN-PAR',5E16.8)
      WRITE(4,21) FF,IRF,KENN
   21 FORMAT(1H ,'MIN-OUT',E16.8,2I4)
      RETURN
      END
C*****************************************************************
```

```
      SUBROUTINE ANGEBT(I,XW,IT)
C*****
      EXTERNAL FUN
      COMMON/FITCO/FA(100),T(200),POL(30),I,J,NX,X(15),XXK,FUNE
      DIMENSION XW(20)
      EPS=1.E-6
      XXK=XW(1)
      AB=AINTEG(FUN,0.0,T(I),EPS)
      FUNE=XW(1)*EXP(-XW(1)*T(I))*AB
      WRITE(6,20) I,T(I),AB,FUNE,FA(I)
   20 FORMAT(' ',I4,5E14.6)
      RETURN
      END
      FUNCTION FUN(U)
C*****
      COMMON/FITCO/FA(100),T(200),POL(30),I,J,NX,X(15),XXK,FUNE,I
     ,,DX5,IP,PT(100),C(4),FACT
      AB=0.0
      IF(U.GT.FACT) AB=C(1)*EXP(-C(2)*U)
      IF(U.LE.FACT) AB=-C(3)*(U-FACT)**2+C(4)
      FUN=EXP(XXK*U)*AB
      RETURN
      END
C*****
C          HAUPTPROGRAMM
C*****
C*********VERFASSER: R.J. BUCHER 1981
      COMMON/FITCO/FA(100),T(200),POL(30),I,J,NX,X(15),XXK,FUNE,
     ,,DX5,IP,PT(100),C(4),FACT,IPET
      DIMENSION XW(20)
      DATA FACT/0.00278/
      READ(5,10) N,M,NX,IVAR,DX5,IPET
      READ(5,10) (X(K),K=1,NX)
      READ(5,10) C(1),C(2)
      C(4)=C(1)*EXP(-C(2)*FACT)
      C(3)=C(4)/FACT**2
C*****N= ZAHL DER PUNKTE,M=0,X(1)=START-PARAMETER,IVAR=VARIANTE
C*****DX5=SCHRITTWEITE,C(1)=PREDURSOR-PARA.,FA=EING.-PUNKTE
C*****T=ZEIT,PT=GEWICHT
      FACT1=FACT
      WRITE(4,61) (C(I),I=1,4)
   61 FORMAT(1H ,'PREC.PAR.',2X,4E16.8)
   10 FORMAT(10F8)
      DO 20 I=1,N
   20 READ(5,10) T(I),FA(I),PT(I)
   31 FORMAT(5E16.8)
      IPR=0
      CALL HIT
      STOP'DE'
      DO 30 I=1,N
      IPR=I
      CALL ANGEKT(I,XW,NT)
      AB=ABS(FA(I)-FUNE)
      WRITE(4,40) I,FA(I),FUNE,AB
   40 FORMAT(1X,'ERG',5X,4E12.6)
   30 CONTINUE
      STOP 'DATENENDE'
      END
```

Lebenslauf

30.11.1951	Geburt als erstes von vier Kindern des Realschullehrers Karl- Heinrich Petersen und seiner Ehefrau Christel Petersen, geb. Heusner, in Schleswig
1958- 1962	Besuch der Volksschule in Süderbrarup
1962- 1972	Besuch des mathematisch- naturwissenschaftlichen Gymnasiums "Goethe Schule" in Flensburg
6.6.72	Reifeprüfung
Oktober 1972	Aufnahme des Chemiestudiums an der Ruhr- Universität Bochum
Oktober 1974	Diplom- Vorprüfung
26.7.77	Diplom- Hauptprüfung
April 1978- Oktober 1981	Anfertigung der vorliegenden Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie I der Ruhr- Universität Bochum
April 1978	Eheschließung mit Jutta von Gehr

Druck und Verarbeitung: copy shop, darmstadt, tel. 21353